



**MİKROORGANİZMALARDAN PEKTİN LİYAZ
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU, NANOÇİÇEK HİBRİT
YAPISININ OLUŞTURULMASI VE MEYVE SUYU
DURULTMA ENDÜSTRİSİNDE KULLANILMASI**

Hicran ÖNEM

Danışman: Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU
Doktora Tezi
Nanobilim ve Nanomühendislik Ana Bilim Dalı
2022
(Her haklı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
NANOBİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

**MİKROORGANİZMALARDAN PEKTİN LİYAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU, NANOÇİÇEK HİBRİT YAPISININ OLUŞTURULMASI
VE MEYVE SUYU DURULTMA ENDÜSTRİSİNDE KULLANILMASI**

(Purification and Characterization of Pectin Lyase Enzyme from Microorganisms, Preparation of Nanoflower Hybrid Structure and Use in Fruit Juice Clarification Industry)

DOKTORA TEZİ

Hicran ÖNEM

Danışman: Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU

Erzurum
Haziran, 2022

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Hicran ÖNEM tarafından hazırlanan “**Mikroorganizmalardan pektin liyaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu, nanoçiçek hibrit yapısının oluşturulması ve meyve suyu durultma endüstrisinde kullanılması**” başlıklı çalışması 27/07/2022 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı, Nanobiyoteknoloji Bilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Azize ALAYLI <i>Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Mustafa ERAT <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Aziz PAŞAHAN <i>İnönü Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Kezban ATACAN <i>Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü
Aslı Islak İmzalıdır

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak *Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU* danışmanlığında sunulan “**Mikroorganizmalardan pektin liyaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu, nanoçiçek hibrit yapısının oluşturulması ve meyve suyu durultma endüstrisinde kullanılması**” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	16	30
Kuramsal Temeller	9	30
Materyal ve Yöntem	14	35
Bulgular	15	20
Tartışma	17	20
Tezin Geneli	12	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Hicran ÖNEM	Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU
27.7.2022	27.7.2022
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması/patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, iyi bir çalışma ortamı sağlayan ve her daim benim yanımda olan saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU'na teşekkürlerimi arz ederim.

Laboratuvar çalışmalarım esnasında bana yardım ve desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Azize ALAYLI hocama,

Tezimin deney aşamasında laboratuvar koşullarından yararlanmamı sağlayan Erzurum Meslek Yüksekokulu Müdürlüğü'ne teşekkür ederim.

XRD, SEM, TEM ve FT-IR karakterizasyon analizlerinin yapılmasında yardım aldığımız Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğü (DAYTAM)'a,

Deneysel çalışmalar sırasında yardımlarını esirgemeyen bana destek olan Dr. Aynur Babagil arkadaşşıma teşekkür ederim.

Bütün bu süreçte maddi manevi destekleriyle hayatımın her daim yanımda olan ailem Halil ÖNEM, Ayşe ÖNEM, Hatice AKSOY ve Muhammed AKSOY'a teşekkürlerimi sunarım.

Hicran ÖNEM

ÖZET

DOKTORA TEZİ

MİKROORGANİZMALARDAN PEKTİN LİYAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU, NANOÇİÇEK HİBRİT YAPISININ OLUŞTURULMASI VE MEYVE SUYU DURULTMA ENDÜSTRİSİNDE KULLANILMASI

Hicran ÖNEM

Danışman: Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU

Amaç: Pektin liyaz (PL) enzimleri transeliminasyon mekanizmaları yoluyla α -1,4-bağlantılarını parçalayan depolimerazlardır. Bu çalışmada; farklı kaynaklardan temin edilen mikroorganizmalardan üçlü faz ayırma (ÜFA) yöntemi ile pektin liyaz (PL) enzimini saflaştırılması, hibrit nanoçİçek yapısının oluşturulurak immobilize edilmesi ve bu yapı kullanılarak meyve suyu berraklaştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Yapılan çalışmada, farklı kaynaklardan temin edilen mikroorganizmalar PL enzim aktivitesini belirlemek için katı kültür fermentasyon ortamında inoküle edilip gelişme sıcaklıklarında inkübasyona bırakıldıktan sonra enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Daha sonra yüksek PL enzim aktivitesine sahip mikroorganizmalardan PL, ÜFA yöntemi ile saflaştırılarak karakterizasyonu yapılmıştır. SDS-PAGE elektroforez yöntemi ile enzimin moleköl ağırlığı tespit edilmiştir. ÜFA yöntemi ile saflaştırılan PL enzimleri ile hibrit nanoçİçek yapıları oluşturulmuştur. Hibrit nanoçİçek yapıları SEM, TEM, EDX, FT-IR ve XRD ile karakterize edilmiştir.

Bulgular: *L. plantarum*, *A. pallidus* ve *P. fragi*'den üretilerek ÜFA metoduna göre saflaştırılan PL enzimleri sırasıyla %81,5, %82 ve %78,1 verim ve 74,8, 158,71 ve 63,9 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin moleköl ağırlıkları SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile sırasıyla 39, 18 ve 65 kDA olarak belirlenmiştir. Elde edilen PL enzimleri ile hibrit nanoçİçek yapıları iyonotropik jelasyon yöntemi ile sentezlenmiştir. Saflaştırılan serbest ve hibrit nanoçİçek yapısındaki pektin liyaz enzimlerinin meyve suyu üretim prosesinde kullanıldığında pektin parçalanma oranı ve meyve suyu berraklığı kontrol olarak enzim yerine saf su kullanılan gruplar ile karşılaştırılarak bulunmuştur.

Sonuç: *L. plantarum*, *A. pallidus* ve *P. fragi*'den üretilerek ÜFA metoduna göre saflaştırılan PL enzimi ile oluşturulan hibrit nanoçİçek yapıların, yüksek kararlılık ve stabilite ile meyve suyu üretim proseslerin de başarıyla kullanılabileceği anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Pektin liyaz, ÜFA, hibrit, nanoçİçek, meyve suyu berraklaştırma

Temmuz 2022, 132 sayfa

ABSTRACT

DOCTORAL DISSERTATION

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PECTIN LYASE ENZYME FROM MICROORGANISMS, PREPARATION OF NANOFLOWER HYBRID STRUCTURE AND USE IN FRUIT JUICE CLARIFICATION INDUSTRY

Hicran ÖNEM

Supervisor: Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU

Objective: Pectin lyase (PL) enzymes are depolymerases that cleave α -1,4-linkages through transelimination mechanisms. In this study; purification of pectin lyase (PL) enzyme from microorganisms obtained from different sources by triple phase separation (ÜFA) method, immobilization by forming hybrid nanoflower structure and clarification of fruit juice using this structure were aimed.

Materials and Methods: In this study, microorganisms obtained from different sources were inoculated in solid culture fermentation medium to determine the PL enzyme activity and their enzyme activities were measured after incubation at growth temperatures. Then, PL, which is one of the microorganisms with high PL enzyme activity, was purified by the UFA method and characterized. The molecular weight of the enzyme was determined by SDS-PAGE electrophoresis method. Hybrid nanoflower structures were formed with PL enzymes purified by PFA method. Hybrid nanoflower structures were characterized by SEM, TEM, EDX, FT-IR and XRD.

Results: PL enzymes produced from *L. plantarum*, *A. pallidus* and *P. fragi* and purified according to the UFA method were purified in 81.5%, 82% and 78.1% yields and 74.8, 158.71 and 63.9 times, respectively. The molecular weights of the purified pectin lyase enzymes were determined as 39, 18 and 65 kDA by SDS polyacrylamide gel electrophoresis, respectively. Hybrid nanoflower structures with the obtained PL enzymes were synthesized by ionotropic gelation method. When the pectin lyase enzymes in the purified free and hybrid nanoflower structure were used in the fruit juice production process, the pectin degradation rate and juice clarity were compared with the groups in which pure water was used instead of the enzyme as a control.

Conclusion: Hybrid nanoflower structures formed with PL enzyme produced from *L. plantarum*, *A. pallidus* and *P. fragi* and purified according to the PFA method can be successfully used in fruit juice production processes with high stability and stability.

Keywords: Pectin lyase, ÜFA, hybrid, nanoflower, juice clarification.

July 2022, 132 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
GİRİŞ.....	1
Nanoteknoloji ve Nanobiyoteknoloji	1
Enzimlerin Tarihçesi	3
Enzimler	4
Enzimlerin Saflaştırılması.....	5
Üçlü faz sistemleri.....	5
Enzim İzolasyon Kaynakları	8
Pektin	9
Pektin Liyaz	10
Pektin liyazlarla ilgili enzimler	11
Pektin liyaz deneyi	13
Pektin liyaz kaynakları	13
Pektin liyaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu	14
Pektin liyaz enziminin yapısı	14
Pektin liyaz enziminin substrat spesifikliğı	15
Pektin liyaz enziminin moleküler biyolojisi	15
Biyoteknolojik uygulamalar.....	16
Enzim İmmobilizasyonunun Tarihçesi	17
Enzim İmmobilizasyonu	18
Destek materyalinin seçimi	19
İmmobilize enzimlerin özellikleri	20
Enzim immobilizasyonunun biyolojisi	21

Hibrit Nano Yapılar.....	21
Nanoçiçeklerin türleri.....	24
Yapısal özellikleri ve enzim verimliliği.....	29
Hibrit nanoçiçeklerin oluşum mekanizması.....	30
Kitosan	30
Mikroorganizmalar.....	32
<i>Lactobacillus plantarum</i>	32
<i>Aeribacillus pallidus</i>	33
<i>Pseudomonas fragi</i>	33
KAYNAK ÖZETLERİ.....	34
MATERYAL ve METOT	55
Materyal	55
Mikroorganizmaların izolasyon kaynakları	55
Kullanılan kimyasallar	55
Kullanılan cihazlar	55
Çalışmada kullanılan çözeltiler ve hazırlanması.....	56
Metot	59
Mikroorganizmaların izolasyonu	59
Gram reaksiyonlarının belirlenmesi.....	59
Katalaz reaksiyonlarının belirlenmesi.....	59
Mikroorganizmaların tanımlanması.....	60
Pektin liyaz aktivite tayini.....	60
Bradford metoduna göre protein tayini	61
Pektin liyaz enziminin üçlü faz ayırma tekniğine göre saflaştırılması	61
Pektin liyaz enziminin SDS-PAGE yöntemi ile molekül ağırlığının belirlenmesi.....	62
Pektin liyaz enziminin optimum pH değerinin belirlenmesi.....	62
Pektin liyaz enziminin stabil pH değerinin belirlenmesi	62
Pektin liyaz enziminin optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi.....	62
Pektin liyaz enziminin stabil sıcaklık değerinin belirlenmesi.....	63
Pektin liyaz enziminin metal iyonları etkisinin belirlenmesi.....	63
Pektin liyaz enziminin V_{max} ve K_m değerlerinin belirlenmesi	63
Pektin Liyaz- Ca^{2+} hibrit nanoçiçek yapılarının sentezi.....	63
Pektin Liyaz- Ca^{2+} hibrit nanoçiçek yapılarının SEM, EDX, XRD, FT-IR ve TEM karakterizasyonu	64
Yeniden kullanılabilirlik çalışmaları.....	64

Meyve suyu denemeleri	64
ARAŞTIRMA BULGULARI	65
Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları	65
Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri	65
<i>L. plantarum</i> , <i>A. pallidus</i> ve <i>P. fragi</i> 'den Üretilen ve Üçlü Faz Ayırma Metoduna Göre Saflaştırılan Pektin Liyaz (PL) Enzim Sonuçları	66
Saflaştırılan Pektin Liyaz İzoenzimlerinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrophorez Sonuçları	71
Saflaştırılan Pektin Liyaz İzoenziminin Hibrit Yapısının Sentezi ve Karakterizasyonu.....	72
Saflaştırılan Pektin Liyaz İzoenzimlerinin Hibrit Bağlanma Oranının Belirlenmesi	72
Saflaştırılan Pektin Liyaz İzoenzimlerinin Hibrit Yapısının Tekrar Kullanılabilirliği	73
Saflaştırılan Pektin Liyaz İzoenzimlerinin Hibrit Yapısının SEM, EDX Karakterizasyonu.....	73
<i>L. plantarum</i> , <i>A. pallidus</i> ve <i>P. fragi</i> 'den Üretilen ve Üçlü Faz Ayırma Metoduna Göre Saflaştırılan Pektin Liyaz Enziminin Hibrit Yapısının XRD Analiz Sonuçları	80
<i>L. plantarum</i> , <i>A. pallidus</i> ve <i>P. fragi</i> 'den Üretilen ve Üçlü Faz Ayırma Metoduna Göre Saflaştırılan Pektin Liyaz Enziminin Hibrit Yapısının FT-IR Analiz Sonuçları ...	82
Saflaştırılan Pektin Liyaz İzoenzimlerinin Hibrit Yapısının TEM Analiz Sonuçları	84
Saflaştırılan Serbest ve Hibrit pl Optimum pH, Optimum Sıcaklık, Stabil pH ve Stabil Sıcaklık Sonuçları	85
Saflaştırılan Serbest ve Hibrit PL İzoenzim Aktiviteleri Üzerine Hg_2^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ve Mg^{2+} Metal İyonlarının <i>in vitro</i> Etkilerinin Sonuçları.....	94
Saflaştırılan Serbest ve Hibrit Pektin Liyaz Enziminin V_{max} ve K_m Değerlerinin Belirlenmesi	98
Saflaştırılan Serbest ve Hibrit Nanoçiçek Pektin Liyaz İzoenzimlerinin Meyve Suyu Üretim Prosesi Sonuçları.....	103
TARTIŞMA ve SONUÇ	109
Tartışma.....	109
Sonuç.....	118
KAYNAKLAR.....	120
ÖZGEÇMİŞ.....	133

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1. Pektinazların Sınıflandırılması	12
Tablo 2. İmmobilize Enzimin Gelişmesindeki Adımlar	17
Tablo 3. Nanoçiçeklerin Farklı Metal İyonu ve Substratlarla Uygulama Alanları.....	29
Tablo 4. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmaların Gram ve Katalaz Reaksiyonu	65
Tablo 5. <i>L. plantarum</i> Bakterisinden ÜFA Metodu İle Saflaştırılan Pektin Liyaz Enzimine Ait Saflaştırma Profili	67
Tablo 6. <i>A. pallidus</i> Bakterisinden ÜFA Metodu İle Saflaştırılan Pektin Liyaz Enzimine Ait Saflaştırma Profili	67
Tablo 7. <i>P. fragi</i> Bakterisinden ÜFA Metodu İle Saflaştırılan Pektin Liyaz Enzimine Ait Saflaştırma Profili	68
Tablo 8. PL Enziminin Hibrit Bağlanma Oranları.....	73
Tablo 9. <i>L. plantarum</i> Bakterisinden Üretilerek Saflaştırılan PL Enziminin pH 5'te Hibrit Nanoçiçek Yapısının EDX Analiz Sonuçları.....	76
Tablo 10. <i>A. pallidus</i> Bakterisinden Üretilerek Saflaştırılan pl Enziminin pH 5'te Hibrit Nanoçiçek Yapısının EDX Analiz Sonuçları.....	78
Tablo 11. <i>P. fragi</i> Bakterisinden Üretilerek Saflaştırılan PL Enziminin pH 5'te Hibrit Nanoçiçek Yapısının EDX Analiz Sonuçları.....	80
Tablo 12. <i>L. plantarum</i> 'dan Üretilip Saflaştırılan Pektin Liyaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} ve Hg_2^{2+} 'nın Etkisinin Sonuçları.....	95
Tablo 13. <i>P. fragi</i> 'den Üretilip Saflaştırılan Pektin Liyaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} ve Hg_2^{2+} 'nın Etkisinin Sonuçları	96
Tablo 14. <i>A. pallidus</i> 'dan Üretilip Saflaştırılan Pektin Liyaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} ve Hg_2^{2+} 'nın Etkisinin Sonuçları.....	97
Tablo 15. <i>L. plantarum</i> Bakterisinde Üretilerek Üfa Metodu İle Saflaştırılan Serbest ve Hibrit PL Enziminin Pektin, Locus Beam Gum ve Kitin Substratlarına ait $V_{\max}$ ve K_m Sonuçları	102
Tablo 16. <i>A. pallidus</i> Bakterisinde Üretilerek ÜFA Metodu İle Saflaştırılan Serbest ve Hibrit PL Enziminin Pektin, Locus Beam Gum ve Kitin Substratlarına ait $V_{\max}$ ve K_m Sonuçları	102

Tablo 17. <i>P. fragi</i> Bakterisinde Üretilerek ÜFA Metodu İle Saflaştırılan Serbest ve Hibrit PL Enziminin Pektin, Locus Beam Gum ve kitin Substratlarına ait V_{max} ve K_m Sonuçları	102
Tablo 18. <i>L. plantarum</i> Bakterisinden Elde Edilen Serbest ve Hibrit PL Enzimi Eklenen Meyve Suyu Durultma Deneylerindeki Meyve Pürelerinin Kuru Madde Tayini Sonuçları	105
Tablo 19. <i>A. pallidus</i> Bakterisinden Elde Edilen Serbest ve Hibrit PL Enzimi Eklenen Meyve Suyu Durultma Deneylerindeki Meyve Pürelerinin Kuru Madde Tayini Sonuçları	105
Tablo 20. <i>P. fragi</i> Bakterisinden Elde Edilen Serbest ve Hibrit PL Enzimi Eklenen Meyve Suyu Durultma Deneylerindeki Meyve Pürelerinin Kuru Madde Tayini Sonuçları	106
Tablo 21. <i>L. plantarum</i> Bakterisinden Üretilen ve Üçlü Faz Ayırma Metoduna Göre Saflaştırılan Serbest ve Hibrit PL Enzimi Etkisiyle Edilen Meyve Suyu Miktarının Kontrole Göre Artış Oranı	106
Tablo 22. <i>A. pallidus</i> Bakterisinden Üretilen ve Üçlü Faz Ayırma Metoduna Göre Saflaştırılan Serbest ve Hibrit PL Enzimi Etkisiyle Edilen Meyve Suyu Miktarının Kontrole Göre Artış Oranı	107
Tablo 23. <i>P. fragi</i> Bakterisinden Üretilen ve Üçlü Faz Ayırma Metoduna Göre Saflaştırılan Serbest ve Hibrit PL Enzimi Etkisiyle Edilen Meyve Suyu Miktarının Kontrole Göre Artış Oranı	107
Tablo 24. <i>L. plantarum</i> Bakterisinden Üretilen ve Üçlü Faz Ayırma Metoduna Göre Saflaştırılan Serbest ve Hibrit PL Enzimi Eklenen Meyve Pürelerinden Elde Edilen Meyve Suyu Optik Dansitedeki 660 nm Absorbansdaki % Berraklaşma Oranları	108
Tablo 25. <i>A. pallidus</i> Bakterisinden Üretilen ve Üçlü Faz Ayırma Metoduna Göre Saflaştırılan Serbest ve Hibrit PL Enzimi Eklenen Meyve Pürelerinden Elde Edilen Meyve Suyu Optik Dansitedeki 660 nm Absorbansdaki % Berraklaşma Oranları	108
Tablo 26. <i>P. fragi</i> Bakterisinden Üretilen ve Üçlü Faz Ayırma Metoduna Göre Saflaştırılan Serbest ve Hibrit PL Enzimi Eklenen Meyve Pürelerinden Elde Edilen Meyve Suyu Optik Dansitedeki 660 nm Absorbansdaki % Berraklaşma Oranları	108

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Nanopartikül sentezinde farklı yaklaşımlar ve metotlar.....	2
Şekil 2. Enzim yapısında bulunan kısımlar	4
Şekil 3. A) uygun t-bütanol konsantrasyonuna sahip homojenat karışımı, B) uygun tuz ve t-bütanol konsantrasyonuna sahip karışım C) santrifüjlenmiş karışım	8
Şekil 4. Enzim izolasyon kaynaklarından enzim üretim prosesi.....	9
Şekil 5. Pektinin yapısı	10
Şekil 6. Pektin liyazın etki mekanizması.....	11
Şekil 7. Nanomalzemelere immobilizasyon teknikleri.....	22
Şekil 8. Nanoçiçeklerin uygulama alanları.....	24
Şekil 9. Kitosanın genel yapısı	31
Şekil 10. Kitosan birimindeki fonksiyonel gruplar	31
Şekil 11. Bradford yöntemi ile protein tayini için kullanılan standart grafik.....	66
Şekil 12. <i>L. plantarum</i> bakterisinden saflaştırılan PL enziminin ekstrakt:n-bütanol oranı.....	68
Şekil 13. <i>L. plantarum</i> bakterisinden saflaştırılan PL enziminin ekstrakt:amonyum sülfat oranı	68
Şekil 14. <i>A. pallidus</i> bakterisinden saflaştırılan PL enziminin ekstrakt:n-bütanol oranı	69
Şekil 15. <i>A. pallidus</i> bakterisinden saflaştırılan PL enziminin ekstrakt: 1. amonyum sülfat oranı	69
Şekil 16. <i>A. pallidus</i> bakterisinden saflaştırılan PL enziminin ekstrakt: 2. amonyum sülfat oranı	70
Şekil 17. <i>P. fragi</i> bakterisinden saflaştırılan PL enziminin ekstrakt:n-bütanol oranı	70
Şekil 18. <i>P. fragi</i> bakterisinden saflaştırılan PL enziminin ekstrakt:amonyum sülfat oranı	70
Şekil 19. Üçlü faz ayırma yöntemi ile saflaştırılan PL enziminin SDS-PAGE görüntüsü. I: Standart protein örneği, II: <i>L. plantarum</i> bakterisinden saflaştırılan PL enzimi, III: <i>P. fragi</i> bakterisinden saflaştırılan PL enzimi, IV: <i>A. pallidus</i> bakterisinden saflaştırılan PL enzimi.	72
Şekil 20. Hibrit PL enziminin pektin substratı ile hidrolizi için tekrar kullanılabilirliği esnasında aktivitesindeki değişim	73
Şekil 21. <i>L. plantarum</i> bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin pH 5'te hibrit nanoçiçek yapısı	75

Şekil 22. <i>L. plantarum</i> bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin pH 5'te hibrit nanoçiçek yapısının EDX yapısı	76
Şekil 23. <i>A. pallidus</i> bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin pH 5'te hibrit nanoçiçek yapısı	77
Şekil 24. <i>A. pallidus</i> bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin pH 5'te hibrit nanoçiçek yapısının EDX grafiği	78
Şekil 25. <i>P. fragi</i> bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin pH 5'te hibrit nanoçiçek yapısı	79
Şekil 26. <i>P. fragi</i> bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin pH 5'te hibrit nanoçiçek yapısının EDX yapısı	80
Şekil 27. <i>L. plantarum</i> bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısına ait XRD grafiği	81
Şekil 28. <i>A. pallidus</i> bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısına ait XRD grafiği	81
Şekil 29. <i>P. fragi</i> bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısına ait XRD grafiği	82
Şekil 30. <i>L. plantarum</i> 'dan üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısının FT-IR spektrumu analiz sonuçları	83
Şekil 31. <i>A. pallidus</i> 'dan üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısının FT-IR spektrumu analiz sonuçları	83
Şekil 32. <i>P. fragi</i> 'den üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısının FT-IR spektrumu analiz sonuçları	84
Şekil 33. <i>L. plantarum</i> 'dan üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısının TEM analiz sonuçları	84
Şekil 34. <i>A. pallidus</i> 'dan üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısının TEM analiz sonuçları	85
Şekil 35. <i>P. fragi</i> 'den üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısının TEM analiz sonuçları	85
Şekil 36. A) <i>L. plantarum</i> B) <i>A. pallidus</i> C) <i>P. fragi</i> bakterilerinden saflaştırılan serbest ve hibrit PL enziminin optimum pH sonuçları	86
Şekil 37. A) <i>L. plantarum</i> B) <i>A. pallidus</i> C) <i>P. fragi</i> bakterilerinden saflaştırılan serbest PL enziminin stabil pH sonuçları	87
Şekil 37. A) <i>L. plantarum</i> B) <i>A. pallidus</i> C) <i>P. fragi</i> bakterilerinden saflaştırılan serbest PL enziminin stabil pH sonuçları (devamı)	88

Şekil 38. A) <i>L. plantarum</i> B) <i>A. pallidus</i> C) <i>P. fragi</i> bakterilerinden saflaştırılan hibrit PL enziminin stabil pH sonuçları	88
Şekil 38. A) <i>L. plantarum</i> B) <i>A. pallidus</i> C) <i>P. fragi</i> bakterilerinden saflaştırılan hibrit PL enziminin stabil pH sonuçları (devamı)	89
Şekil 39. A) <i>L. plantarum</i> B) <i>A. pallidus</i> C) <i>P. fragi</i> bakterilerinden saflaştırılan serbest ve hibrit PL enziminin optimum sıcaklık sonuçları	90
Şekil 40. A) <i>L. plantarum</i> B) <i>A. pallidus</i> C) <i>P. fragi</i> bakterilerinden saflaştırılan serbest PL enziminin stabil sıcaklık sonuçları	91
Şekil 41. A) <i>L. plantarum</i> B) <i>A. pallidus</i> C) <i>P. fragi</i> bakterilerinden saflaştırılan hibrit PL enziminin stabil sıcaklık sonuçları	93
Şekil 42. <i>L. plantarum</i> bakterisinde üretilerek ÜFA metodu ile saflaştırılan serbest ve hibrit PL enziminin (A) pektin, (B) locus beam gum ve (C) kitin substratlarına ait Lineweaver-Burk grafikleri.....	99
Şekil 43. <i>A. pallidus</i> bakterisinde üretilerek ÜFA metodu ile saflaştırılan serbest ve hibrit PL enziminin (A) pektin, (B) locus beam gum ve (C) kitin substratlarına ait Lineweaver-Burk grafikleri.....	100
Şekil 44. <i>P. fragi</i> bakterisinde üretilerek ÜFA metodu ile saflaştırılan serbest ve hibrit PL enziminin (A) pektin, (B) locus beam gum ve (C) kitin substratlarına ait Lineweaver-Burk grafikleri.....	101

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum sülfat
°C	Santigrat derece
A.	<i>Aspergillus</i>
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis sabiti
L	Litre
mM	Milimolar
mU/ml	Mililitredeki mili ünite
nm	Nanometre
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PL	Pektin liyaz
rpm	Dakikada devir sayısı
s	saat
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
U	Ünite

GİRİŞ

Nanoteknoloji ve Nanobiyoteknoloji

Nanoteknoloji, çok küçük boyuttaki atomların incelenmesi ve şekillendirilmesidir. Nanoteknoloji ilk olarak Richard Feynmann tarafından öne sürüldü. “aşağıda bir oda var” adlı sunumuyla moleküler dünyayı açıkladı. Feynman’ın vizyonu nanoteknoloji disiplinini doğurdu ve şimdi onun hayalini gerçeğe dönüştürmek için bilim insanları çok sayıda araştırma yapmaktadır (Goodshell, 2004).

Nanoteknoloji fizik, kimya, biyoloji, malzeme bilimi ve tüm mühendislik disiplinlerini kapsayan multidisipliner bilim dalıdır. Nanometre uzunluk ölçeğinde, yani atom, molekül ve moleküllerüstü yapılar düzeyinde maddenin kontrolü yoluyla malzeme, cihaz ve sistemlerin oluşturulması ve kullanılmasıdır. Mükemmel özellikteki malzemeler ve fonksiyonel sistemler düzenlemek için bu özelliklerin kontrollü ve manipülasyonu kullanılır (Picraux, 2018).

Canlı hücrelerin işlevleri ve özelliklerine bakıldığında nanoteknolojinin biyoteknoloji alanındaki uygulamaları ile nanobiyoteknoloji teriminin kullanılmasına yol açmıştır. Nanobiyoteknoloji biliminin amacı hastalıkların tanı ve tedavisindeki biyolojik olarak gerçekleşen süreçleri anlamaktır. Nanoteknolojideki bu gelişmeler nanoteknolojik ilaç keşfini, ilaç dağıtımını ve ilaç üretimini tasarlamak için kullanılmıştır (Jain, 2008).

Nanoboyutta materyallerin davranışındaki kalitatif farklılıkların, iki temel sebebi vardır. Birincisi, kuantum mekaniği bu boyutta etkilidir ve yeni fizik-kimya yasalarına sebep olur. İkincisi, nanoölçekte bu yapılar büyük yüzey/hacim oranına sahiptir. Bu temel sebeplerden dolayı, atomların yüzey ve arayüzey üzerinde bulunmakta ve enerjilerinin yüksek olması nedeniyle atomların davranışlarının ve özelliklerinin üzerine etkili olmaktadır. Örneğin, bir metal katalizör parçacığının aktivitesi daha küçük boyutlara inildikçe artar. Makro boyutta altın hiçbir tepkime vermezken nanoboyutta çok reaktif ve katalitiktir. Nanoölçekli malzemelerin özellikleri, bileşimi ve yapısıyla birlikte boyutuna da bağlıdır (Hosokawa *et al.*, 2012).

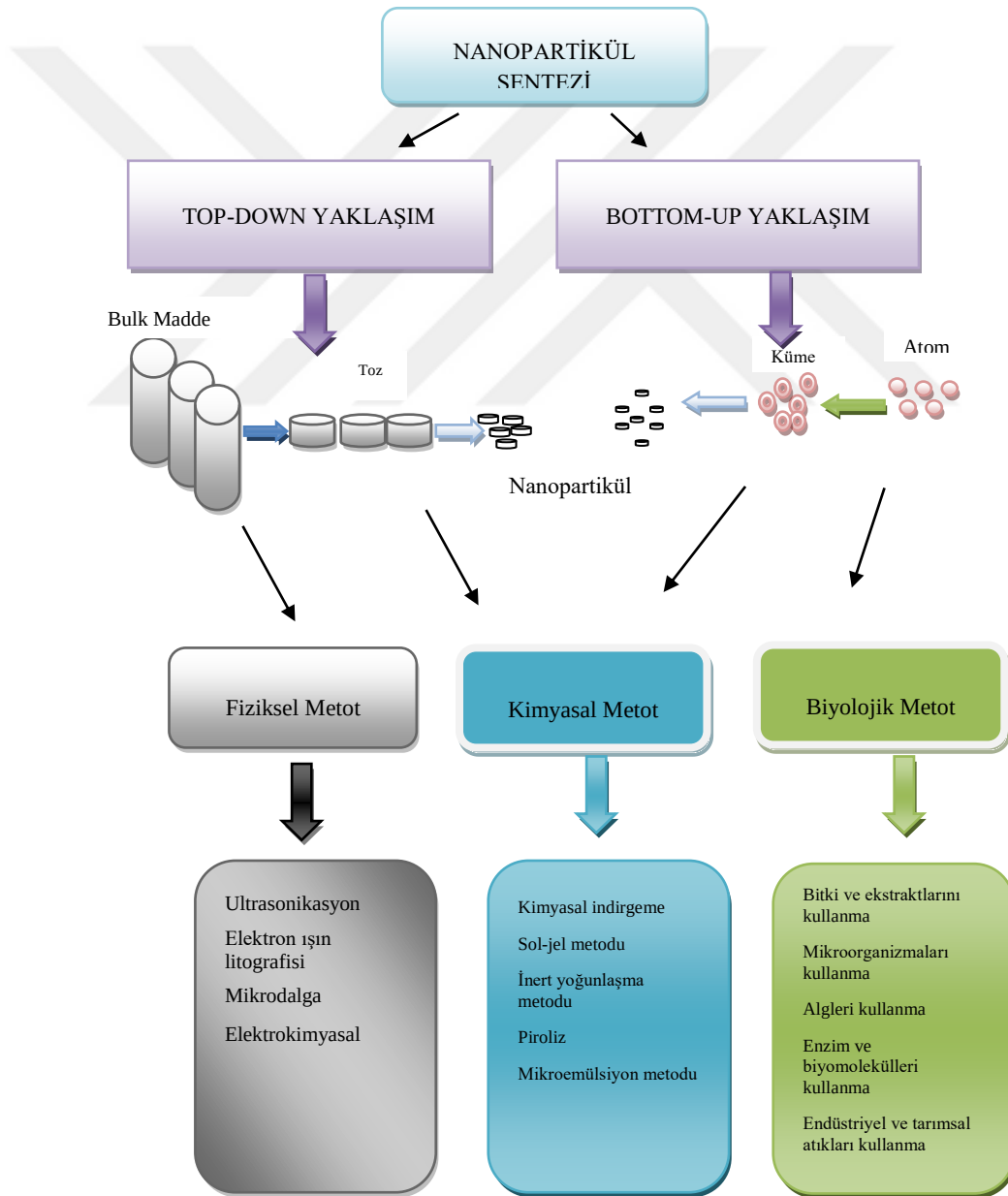
Nanopartikülleri hazırlamak için yaygın olarak kullanılan iki temel yaklaşım vardır. Bu yaklaşımlar kullanılırken, nanopartikül sentezi için en uygun tekniğin basit, verimli ve tekrarlanabilir olması gerekir (Hosokawa *et al.*, 2012).

Top-down yaklaşımında, bulk yapıdaki bir malzemedan kimyasal, mekanik yada diğer enerji çeşitleri kullanılarak nanoboyutta partikül sentezlenmektedir. Bu yaklaşımda

elektrodepozisyon, mekanik öğütme, fotolitografi, elektron ışın litografisi yöntemleri kullanılarak nanoboyutta yapılar üretilmektedir (Çakmak, 2016).

Bottom-up yaklaşımında ise atom veya moleküler düzeyde parçacıkların kimyasal reaksiyon sonucunda nanopartiküller sentezlenmektedir. Monomer/polimer molekül self-assembly, kimyasal veya elektrokimyasal nanoyapısal çöktürme, sol-jel işleme, lazer piroliz ve kimyasal buhar biriktirme (CVD) aşağıdan yukarıya yaklaşımına sayılabilecek örnekleridir (Singh *et al.*, 2011). Genel olarak NP sentezi metotları 3 gruba ayrılmaktadır.

- Fiziksel metot
- Kimyasal metot
- Biyolojik metot



Şekil 1. Nanopartikül sentezinde farklı yaklaşımlar ve metotlar

Nanoteknoloji multidisipliner bir bilim dalı olmasından dolayı diğer bilim dalları ile etkileşim halindedir ve gelişmektedir. Bu gelişme ile nanoteknoloji tıp, elektronik, gıda, yakıt, güneş panelleri, bataryalarda, uzay teknolojisinde, çevre kirliliğinde, hava kirliliğinde, kimyasal sensörlerde ve ilaçlarda kullanılmaktadır (Luther, 2008; Çakmak, 2016).

Enzimlerin Tarihçesi

Biyolojik katalizin ilk çalışmaları 1760-1825 yılları arasında mide salgıları ile etin sindirilmesi ile başlamıştır. 1830 yıllarında Payan ve Persoz tarafından ilk enzim diastaz, Schwann tarafından ise pepsin enzimi keşfedildi. 1850 yıllarında Lous Pasteur şekerin maya ile alkole fermente olmasını canlı hücrelerle gerçekleştirdiği sonucuna varmış ve bu fermentlerin mayaların yapısından ayrılmayacağını kabul etmiştir. Bu fermentler “enzimler” olarak adlandırılmıştır.

İlk asimetrik sentez izole edilmiş bir enzimi kullanarak 1894 yılında Emil Fischer tarafından L-arabinoza siyanohidrin reaksiyonunu uygulayarak yüksek substrat spesifikliğı olan enzimleri belirleyerek gerçekleştirilmiş ve enzimin yapısını sabit olarak kabul edilmiştir (Schoffers *et al.*, 1996). 1897 yılında Eduard Buchner mayaların yapısındaki fermentlerin hücre yapılarından ayrılmasıyla da işlevselliğini kaybetmediğini göstermiştir.

1920 yıllarında çok sayıda farklı enzimin olduğu bilinmektedir. Enzimlerin ticari olarak kullanımına 1960 ve 1970 yıllarında geçilmiştir. Örnek olarak, karbonhidrat enzimleri gıda sanayinde mısır, patates ve diğer nişastalar üzerinde kullanılmaya başlamıştır (Crabb *et al.*, 1997). Ayrıca, deterjanlara proteaz eklenmesiyle enzimlerin önemli bir endüstriyel kullanımı aktif hale gelmiştir. Bu uygulamalar, toplu enzim satışlarının büyük bir kısmını oluştururken, enzimlerin giderek önem kazanan farklı bir uygulaması ise, özel organik kimyasalların sentezinde katalitik bir araç olarak kullanılmasıdır (Gerhartz, 1990; Shimizu *et al.*, 1997).

Biyokatalizörün ilk uygulamalarından biri, 1934'te Reichstein tarafından geliştirilen, glikozdan askorbik asit üretmek için tasarlanan ticari değeri olan reaksiyondur (Turner, 1995).

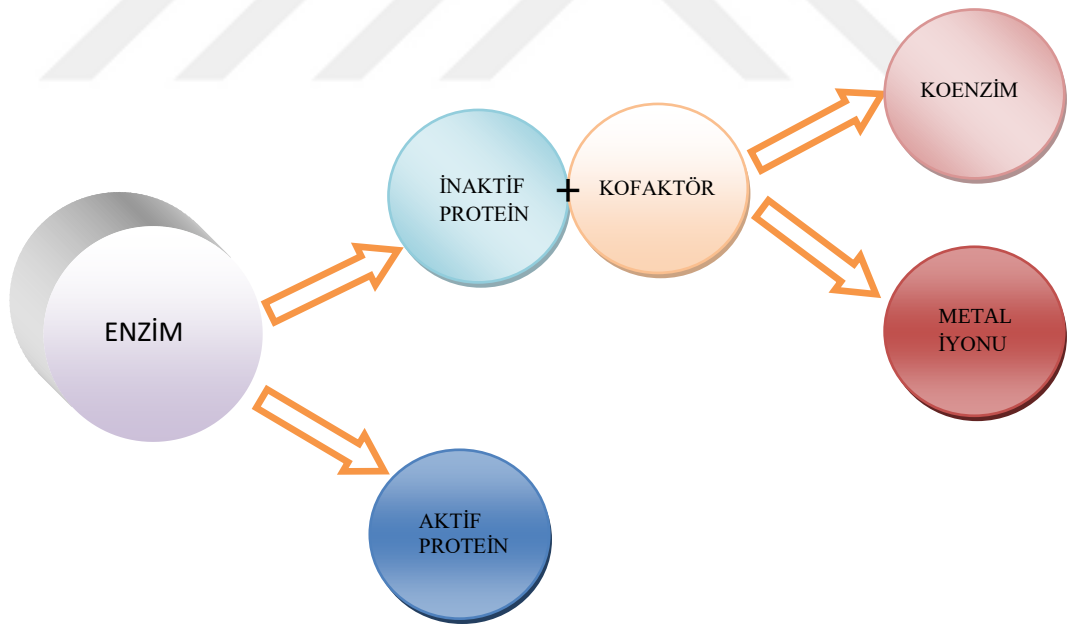
Kimyasal sentez uygulamasında enzim kullanımı ve geliştirilmesi son yıllarda multidisipliner bir araştırma konusu olmuştur. Yeni moleküler tarama tekniklerinin geliştirilmesi ile, rekombinant DNA teknolojileri ve biyokatalizin önemine yeni bir odaklanma alanı haline gelmiştir.

Enzimler

Enzimler; canlı organizmalar tarafından üretilen, kimyasal reaksiyonları hızlandıran, çok sayıda aminoasidin bir araya gelmesiyle oluşan ve %100 ürün verimi sağlayan karmaşık molekül yapılarıdır. Enzimlerin substratlarına özgül olmaları ve katalitik güçleri en önemli özelliklerindendir (Nelson and Cox, 2008).

Enzimlerin katalitik aktiviteleri konformasyon yapılarının sağlamlığına bağlıdır. Eğer enzim alt birimlerine ayrılır veya bozulursa enzim aktivitesini kaybeder. Enzim 3 boyutlu yapısını kaybederse veya aminoasitlerine ayrılırsa aktivitesini kaybeder. Bu yüzden; enzimin primer, sekonder, tersiyer ve kuarterner yapısı katalitik aktivite için esastır (Nelson and Cox, 2008).

Enzimlerin birçoğu protein yapısındadır. Kofaktör olmadan çoğu enzimin katalitik aktivitesi yoktur. Kofaktör; bir metal iyonu veya koenzim olarak adlandırılan organik bir molekül olabilir. Enzimin aktif olmayan protein bileşenine apoprotein denir. Apoprotein ve koenzim bileşimine holoenzim (aktif enzim) adı verilir. Bazı enzimler kofaktörleri diğerlerinden daha sıkı bağlar ve bu kofaktörleri enzime zarar vermeden uzaklaştırmak zordur. Böyle kofaktörler prostetik grup olarak adlandırılır.



Şekil 2. Enzim yapısında bulunan kısımlar

Canlıların yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmeleri için enzimlere ihtiyaç vardır. Hücresel solunum, hücre zarında madde sentezi, sindirim, oksijen taşınması, sinirsel iletim, kas kasılması ve protein sentezi gibi yaşamsal faaliyetler enzimler aracılığıyla gerçekleşir.

Kullanım amacına göre enzimler endüstriyel enzimler, klinik enzimler ve analitik enzimler olmak üzere 3'e ayrılır. Endüstriyel olarak besin, deterjan, tekstil, deri ve kağıt

alanlarında kullanılmaktadırlar. Klinik enzimler çoğunlukla intrasellüler ve ekstrasellüler enzimlerin serum veya plazmada aktivite değişimleri ile ilgilidir (Barredo, 2005). Kalıtsal metabolik hastalıklar, toksik etkiler, kemoterapi gibi süreçlerin tedavi ve tanısında klinik enzimler kullanılmaktadır (Kumar *et al.*, 2011). Analitik enzimler ise hücrelerde gerçekleşen metabolik süreçlerin takibinde kullanılmaktadır (Whitaker, 2015).

Enzimlerin Saflaştırılması

Enzim saflaştırma ve karakterizasyonu yapısal ve fonksiyonel özellikler hakkında bilgi edinmede ve uygulamalarının öngörülmesinde büyük önem taşımaktadır. Enzimin son saflık derecesi o enzimin kullanım alanına bağlıdır. Enzimlerin saflaştırılmasındaki amaç, en yüksek saflıkta, aktivitede ve verimde enzimler elde etmektir. Bu saflaştırma yöntemlerinden bazıları,

- Çöktürme
- Ultrafiltrasyon
- Filtrasyon
- Santrifüj
- Kromatografik yöntemlerdir.

Başarılı ve verimli saflaştırma stratejilerinin anahtarı, minimum adım sayısı ile verimi ve saflığı en üst düzeye çıkaran uygun tekniklerin seçilmesidir (Palmer, 2001).

Üçlü faz sistemleri

Üçlü faz ayırma tekniği, 1997 yılında Lovrien ve Dennison tarafından geliştirilen hedef makromolekülünün saflaştırılmasında kullanılan protein çökelmesinin kolektif birçok basamağını kapsayan, günümüzde geniş bir uygulama alanına sahip çok yönlü ve ortak bir biyo-ayırma aracıdır. Üçlü faz ayırma tekniği, proteinlerin ekstraksiyon ve saflaştırılması işleminde ön akım veya son akım işlemi olarak tek adımda gerçekleşen saflaştırma amaçlı kullanılan, kolay uygulanabilen bir tekniktir (Gagaoua *et al.*, 2016)

Kromatografik yöntemlerin karmaşıklığından dolayı, üçlü faz ayırma yöntemi mikroorganizma, hayvan veya bitki materyallerinden bazı endüstriyel enzimleri daha kolay saflaştırmayı amaçlamaktadır. Ayrıca, kromatografik yöntemlerle ayırma pahalı, zaman alıcı, birden çok basamağı ve ölçeklendirme problemi olan yöntemlerdir. Bu dezavantajları çözmek için enzim saflaştırma yöntemlerine alternatif bir yöntem olan üçlü faz ayırma yöntemi ortaya çıkmaktadır.

Üçlü faz ayırma (ÜFA) tekniği, i)salting out, ii)proteinleri izoiyonik çöktürme, iii)yardımcı çözügenle çöktürme ve iv)osmotik ve v)kosmotropik çöktürme gibi birçok

prensipleri içeren bir ayırma yöntemidir (Saxena *et al.*, 2007). ÜFA tekniğinin temeli; ham protein ekstraktına önce yüksek konsantrasyonda katı tuz (çoğunlukla amonyum sülfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) daha sonra organik bir çözücü (genellikle t-bütanol) ile karıştırılması gerekir. 1-propanol, 2-propanol, etanol, metanol ve t-bütanol gibi alkoller suda çözünmelerine rağmen kozmotrop tuzları çözmemekte ve iki ayrı sıvı faz (alkol fazı üstte ve tuzlu sulu faz altta olmak üzere) oluşur. İstenilen protein santrifüj edildikten sonra pigment, lipit gibi kirleticilerden seçici olarak faz oluşturularak ayrılır. Bütanolce zengin üst kısımdaki faz polar olmayan bileşikler (pigment, lipit, vb.) ve polar bileşikler (protein, karbohidrat, vb.) içeren sulu fazdan bir arayüz protein çökeltisi ile ayrılır. Saflaştırılan protein çökeltisi organik faz ile sulu fazın arasında çözünmeyen fazda kalmaktadır (Rawdkuen, 2010; Rawdkuen *et al.*, 2012; Li, 2013; Gagaoua *et al.*, 2015).

Biyolojik ve kimyasal proseslerde çözelti ortamındaki bazı iyonların etkileri o iyonlara özgüdür. Bu etkilere Hofmeister olayı denir. Hofmeister serisine ait anyon ve katyon sıralamaları aşağıda verilmiştir. Sıralama proteini çöktürme kapasitelerine göre yapılmıştır. (Nostro *et al.*, 2012)



Su çekme gücü (liyotropik) dizisinde klor iyonlarından önceki iyonlara kozmotrop denir. Klor iyonlarından sonraki iyonlar da kaotrop olarak adlandırılmaktadır (Atay vd., 2009). Kozmotroplar çözelti ortamında dengeleme görevi yaptıkları için “konumlayıcı” olarak kaotropolar ise proteinlerin yapısını denatüre ederek hidrofobik etkileşimleri engeller ve çözünürlüğü artırır bu yüzden “konum bozucu” olarak adlandırılırlar.

Üçlü faz ayırma tekniğinde biyolojik moleküllerin (hücre, protein, organel ve biyolojik membranlar) saflaştırılmasında ve ekstraksiyonunda kullanılan etkin bir yöntemdir. ÜFA günümüze kadar birçok proteinin saflaştırılmasında kullanılmıştır. Örneğin, *Aspergillus oryzae*’den invertaz (Dhananjay and Mulimani, 2008) ve α -galaktozidaz (Çalcı *et al.*, 2010), *E. coli*’den yeşil floresan proteini (Jain *et al.*, 2004), domatesten pektinaz (Sharma and Gupta, 2001) ve ragi darısından proteaz inhibitörü (Saxena *et al.*, 2007), saflaştırılmasında kullanılmıştır.

Tuz konsantrasyonunun etkisi

Üçlü fazlı ayırma tekniği diğer saflaştırma tekniklerine (kromatografi, filtrasyon, santrifüjleme ve elektroforez) göre daha avantajlıdır. Tek basamakta gerçekleşen bu teknik ile istenilen proteinin deriştirilmesi ve saflaştırılması mümkün olmaktadır. ÜFA tekniği ile ölçek

saflaştırma için ölçek büyütme mümkündür. Bu tekniğin diğer avantajları, düşük maliyetli olması, enerji tüketiminin ve proses süresinin az olması ve yüksek verimlilik olarak sayılabilir.

Üçlü faz ayrımı (ÜFA) yönteminde tuz konsantrasyonunun fazla olmasından dolayı çözelti ortamının iyonik şiddeti fazladır. Bunun sonucunda hidrofobik etkileşimlere neden olur ve proteinlerin su moleküllerinden uzaklaşıp kümeleşerek çökmesine (salting out) neden olur.

t-bütanol ve NaCl'nin ortamda birlikte bulunduğu çöktürme işleminde düşük konsantrasyondaki t-bütanol moleküllerinin etrafına 20 tane su molekülü kafes gibi yerleştirilerek sıkıştırılır. Böylece t-bütanolün yapısında bulunan alkol grubu ile metil grubu arasındaki dimer yapı hidrofobik etkileşimler sonucunda gevşer (Bowron *et al.*, 2003 ve Palombo *et al.*, 2006). NaCl ilavesiyle, bütanolün alkol grupları anyona (Cl⁻) ilgi gösterir ve amfifil kümeleşme eğilimini artırır. Böylece faz ayrımı gerçekleşir.

Salting out etkisini ilk olarak amonyum sülfat konsantrasyonu, ikincil olarak ise proteinlerin net yükü belirler (Lovrien *et al.*, 1997). Bu nedenle tuzun başlangıçta %20 gibi düşük konsantrasyonlardan başlanarak optimize edilmesi ÜFA tekniği için kritik bir basamaktır.

t-Bütanol etkisi

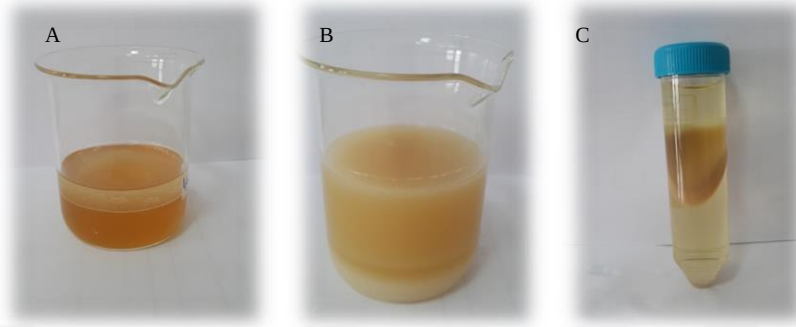
Üçlü faz ayrımı metodu ile t-bütanol arasındaki ilişki şu şekilde açıklanabilir. ÜFA metodunda kullanılan t-bütanol çöken proteinlere batmama özelliği kazandırır. Ara fazda çöken proteinlerin tampon çözeltisinde tekrar çözünmesiyle spesifik ve toplam aktivite geri kazanılır ve bazen bu değerlerde artış olabilir. Yüksek konsantrasyondaki sülfat iyonları kozmotrop davrandığı gibi oda ve yüksek sıcaklıklarda t-bütanol de kozmotrop davranır. Geleneksel bir yöntem olan tuzla protein çöktürmesi gibi kozmotropi de üçlü faz ayrımı yönteminin tamamını oluşturmaz. ÜFA yönteminde elektrostatik kuvvetler, protein konformasyon sıkışıklığından oluşan kuvvet ve protein hidrasyon kaymaları da önemli etkenlerdir (Lovrien *et al.*, 1997).

ÜFA metodunun avantajları;

- Büyük ve küçük ölçekli çalışmalara uygulanabilmesi
- Molekül ağırlığı düşük yapıların; lipidlerin ve fenollü bileşiklerin uzaklaştırılmasıdır.

Santrifüj işlemi ile proteinler orta fazda çöker. Üstteki organik fazda genellikle organik çözücülerde çözünen kontamine yapılar bulunur.

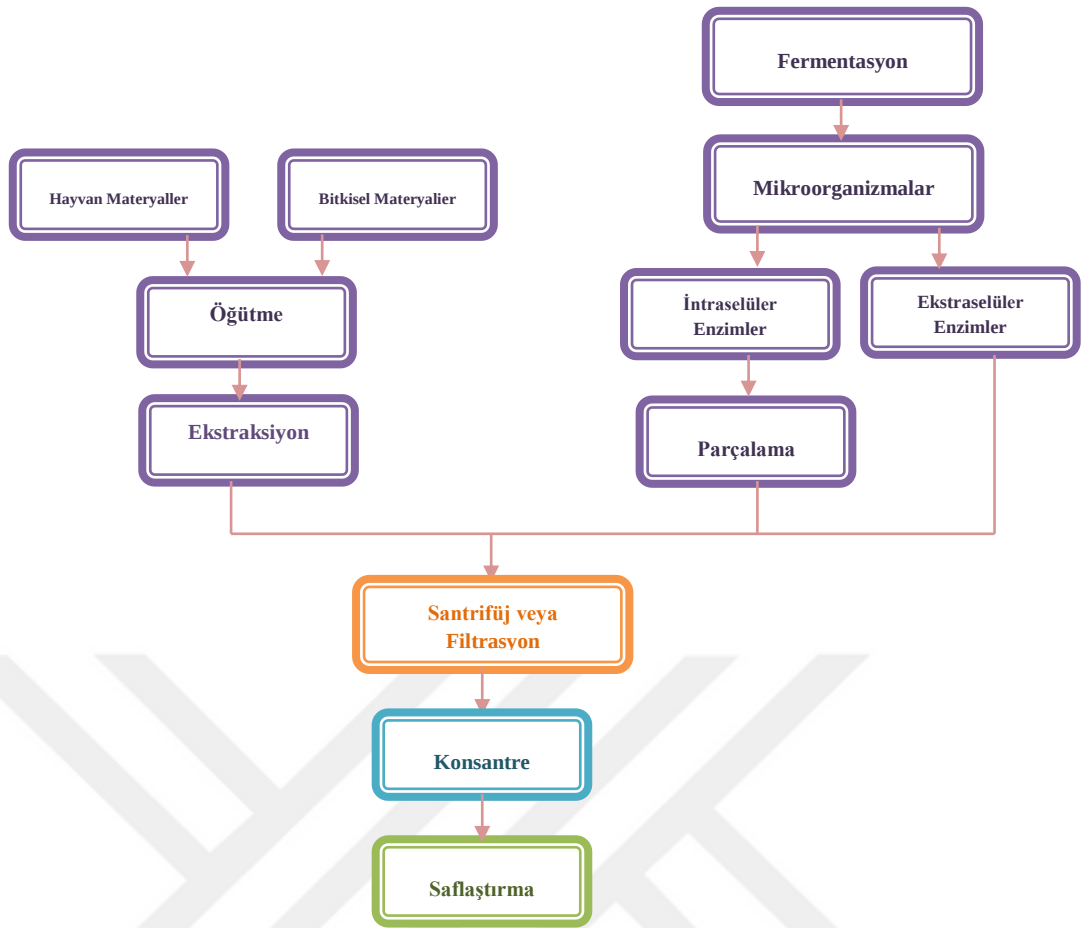
Şekil 3’de ÜFA metodunun faz oluşumu gösterilmiştir. Ortada oluşan çökelek fazı 15 dakikadan sonra oluşmaya başlar. Üst ve alt fazlardaki hidrasyon kaymaları, eklenen amonyum sülfat ve t-bütanol miktarlarına göre değişkenlik gösterebilmektedir.



Şekil 3. A) uygun t-bütanol konsantrasyonuna sahip homojenat karışımı, B) uygun tuz ve t-bütanol konsantrasyonuna sahip karışım C) santrifüjlenmiş karışım

Enzim İzolasyon Kaynakları

Enzim izolasyon kaynaklarına bakıldığında çok farklı kaynakların kullanıldığı görülmektedir. Bunlardan bazıları, bitkiler ve hayvanlardan elde edilen enzimler ve endüstri alanında ihtiyaçların çoğunu karşılayan mikrobiyal enzimler olarak sayılabilir. Bitkisel ve hayvansal enzimler endüstriyel alandaki ihtiyacı karşılayamadığı için mikrobiyal enzimlere ilgi artmaktadır. Mikroorganizmalar genetik değişimlere uygunluğu ve biyolojik çeşitliliğinden dolayı enzim ihtiyacının büyük kısmını karşılamaktadır (Rao *et al.*, 1998). Günümüzde endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin %90’ını mikroorganizmalardan karşılanmaktadır (Godfrey and West,1996). Enzim izolasyon kaynaklarından enzim üretim prosesi Şekil 4’de gösterilmiştir.

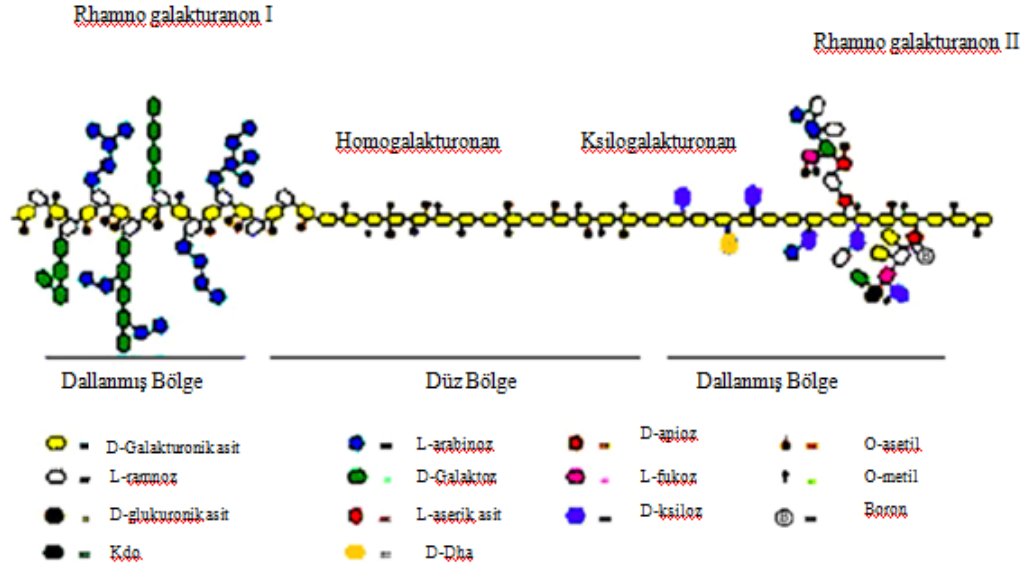


Şekil 4. Enzim izolasyon kaynaklarından enzim üretim prosesi

Pektin

Pektin, metanol ile esterlenmiş karboksilik gruplara sahip polimerik bir malzemedir. Pektin üzerindeki bölgeler “Düz bölge” ve “dallanmış bölge” olmak üzere ikiye ayrılabilir (Şekil 5). Esterleşme derecesi elde edildiği kaynağına bağlıdır. Çoğunlukla yapısal olarak iyi karakterize edilmiş homogalakturnan (HGA), rhamnogalakturnan I ve rhamnogalakturnan II (RG I ve RG II) olmak üzere üç polisakkarit motifinden oluşur (O'Neill *et al.*, 1990; Mohnen, 1999). Bu üç polisakkarit, hücre duvarı parçalayıcı enzimlerin etkisiyle yapılarının modülasyonu için önemli bir potansiyele sahip bir ağ oluşturur. Homogalakturnan, O-6 pozisyonunda metillenebilen α -1,4-bağlı D-galakturnik asit rezidülerini içeren pektin molekülünün omurga zincirini temsil eder. RG I, L-rhamnopyranozun α -1,2'ye bağlı rezidülerinin çok sayıda yan zincirini içeren oldukça dallı bir bölgede bulunurken, bazı bitkilerin primer hücre duvarında daha karmaşık RG II yapısı tanımlanmıştır (Darvill *et al.*, 1978). Bitkilerin hücre duvarının oluşmasında görevli bir moleküldür (Zhang, 2006). Pektin molekülü, rhamnogalakturnan kısmında arabinanlar, galaktanlar veya arabinogalaktanlar gibi β -(1,4) bağlantılarıyla ramnozla bağlanan yan zincirlerle dallanır. Ana yan zincirlerde, arabinoz birimleri α -(1-5) bağlı ve galaktoz birimleri

β -(1-4) bağlantılarıyla birleştirilir. Bu nötr şekerlerin dışında, pektinlerin yan zincirleri ayrıca ksilopiranoz, D-glukopiranoz ve L-fukopiranoz içerebilirken, RG II, D-apioz, 2-O-metil-D-ksiloz ve 2-O-metil-L-fukoz da mevcuttur.



Şekil 5. Pektinin yapısı

RG I'de galakturonik asit rezidüleri genellikle C2 ya da C3 pozisyonundan asetillenebilir fakat homolakturonan bölgesinde de ayrıca asetilasyon gerçekleşir. Genellikle, pektinler değişken bileşimlere sahiptir (Thakur *et al.*, 1997). D-Galakturonik asit kalıntıları, moleküllerin düz ve dallanmış bölgelerdeki kısımlarından oluşturulur. Molekül, çözelti ortamında esneyerek uzar ve solucan gibi kavislenir ancak düz konformasyon göstermez. Pektin moleküllerinin dallanmış bölgeleri diğer bölgelere göre daha esnek yapıda ve asılı arabinogalaktanlara sahip olabilir. Karboksilat grupları, iki değerli katyonik köprüleme (pK_a 'ları yaklaşık 2,9'dur) ile etkileşime girmedikçe yükleri sonucunda pektinlerin yapısını genişletme eğilimindedir (Ralet *et al.*, 2001)

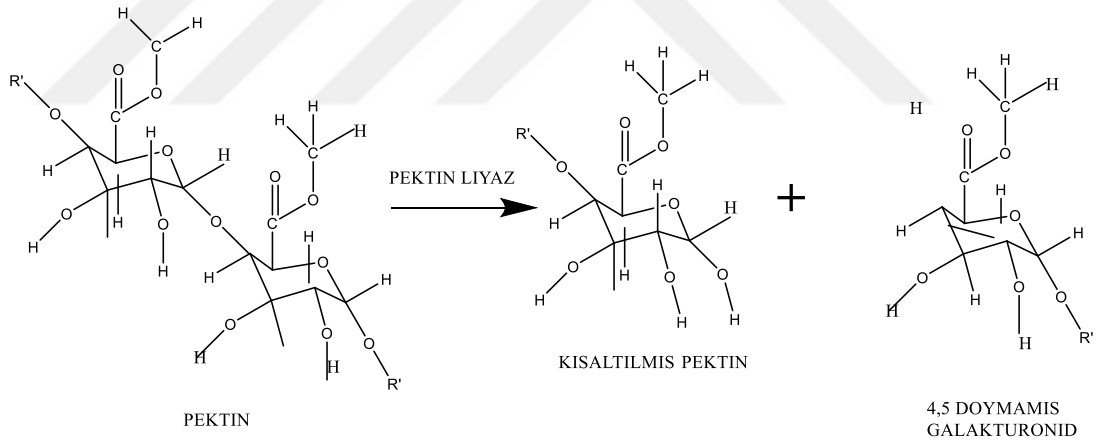
Bu karboksilik asit gruplarının metilasyonu, benzer bir yer kaplayan ancak çok daha fazla hidrofobik olan ve sonuç olarak çevredeki suyun yapılanması üzerinde farklı bir etkiye sahip olan metil esterlerini oluşturur. Pektinler özellik olarak, yaklaşık %70 olan normal esterleşme derecesine bağlıdır. Farklı kaynaklardan elde edilen pektinlerin bileşiminde önemli farklılıklar gözlemlendiğinden, pektin liyaz enzimleri için K_m ve k_{cat} gibi kinetik özelliklerin de çalışmalar için kullanılan pektin kaynağın bağlı olarak farklılıklar göstermesi beklenir.

Pektin Liyaz

Bitki patojenleri, konakçı dokuya patojenin girişini ve üremesini kolaylaştıran bir dizi hücre duvarı parçalayıcı enzim üreterek hedef hücrelere saldırır. Bu tür fitopatogenik enzimler

arasında pektinazlar, selülozlar ve proteazlar bulunur. Pektinazlar, substrat spesifikliğine ve etki mekanizmasına bağlı olarak çeşitli sınıflara ve alt sınıflara ayrılmış bir dizi enzimi, örneğin metil deesterazları, hidrolazları ve liyazları içerir. Tüm iki çenekli ve bazı tek çenekli bitkilerin primer hücre duvarlarının ana bileşenini oluşturan pektik polimerlerin bozulması, bitki enfeksiyonları sırasında çoğu mantar patojenleri tarafından gerçekleştirilen reaksiyonlardan birisidir (Cooper, 1984; Carpita and Gibeaut, 1993).

Tüm pektinazlar arasında, pektin liyazlar özel ilgi konusudur, çünkü pektin polimerlerini doğrudan β -ayırma mekanizması ile indirgeyerek, 4,5-doymamış oligogalakturnidlerin oluşmasına neden olurken diğer pektinazlar pektin molekülünü tamamen parçalamak için sırayla hareket eder (Şekil 6). Mikrobiyal fitopatogeneze pektin liyazın rolüne ek olarak, bu enzim meyve suyu endüstrisinde meyve suyunun spesifik aromasından sorumlu olan ester grubunu bozmadan pektini parçaladığı ve ayrıca toksik olan metanol oluşumuna neden olmadığı için biyoteknolojik potansiyele sahiptir (Taragano and Pelesof, 1999). Pektin liyaz enzimi, tekstil endüstrilerinde potansiyel zımk giderme uygulamalarında ve doğal elyafların yumuşatılmasında kullanılmaktadır (Hoondal *et al.*, 2002).



Şekil 6. Pektin liyazın etki mekanizması

Pektin liyazlarla ilgili enzimler

Pektinin parçalanmasında görev yapan genel olarak pektinazlar olarak bilinen bir grup pektinolitik enzim bulunur. Bu enzimlerin etki mekanizması ve substrata bağlı sınıflandırılması Tablo 1’de verilmiştir. Pektinlerin yapısındaki büyük çeşitlilik nedeniyle, homogalakturnondan oluşan pürüzsüz bölgelere ve ramnogalakturnon ve yan zincirlerden oluşan dallanmış bölgeye etki eden enzimlere göre sınıflandırılabilirler. Pektinlerin dallanmış bölgesinin parçalanmasında rol oynayan ramnogalakturnon hidrolaz (RG hidrolaz), ramnogalakturnon liyaz, ramnogalakturnon rhamnohidrolaz (RG rhamnohidrolaz) ve

rhamnogalakturonan galaktohidrolaz (RG galactouronohidrolaz) enzim gruplarıdır (Schols *et al.*, 1990; Suykerbuyk *et al.*, 1995). Bununla birlikte α -arabinofuranosidaz (EC 3.2.1.55), endoarabinaz (EC 3.2.1.99), β -galaktosidaz (EC 3.2.1.23), endogalaktanaz (EC 3.2.1.89), feruloil ve p-koumaroil esterazları içeren yan zincirlerinin parçalanmasında rol oynayan başka yardımcı enzimler de vardır (de Vries, 1999).

Düz bölgenin (homogalakturonan) parçalanmasına katılan enzim grupları pektin üreten poligalakturonik asitin metoksi ve asetil rezidülerini uzaklaştıran pektin asetil esteraz (PAE, E.C. 3.1.1.6) ve pektin metil esteraz (PME, E.C. 3.1.1.11) gibi diesterleşme enzimlerini içerir. Homogalakturonan parçalama grubunun diğer alt sınıfı genel olarak ya poligalakturonazlar (PG, EC 3.2.1.15) gibi hidrolizleri yada pektat liyaz (E.C. 4.2.2.2) ve pektin liyaz (PL, E.C. 4.2.2.10) olarak adlandırılan transeliminasyon mekanizmaları yoluyla α -1,4-bağlantılarını parçalayan depolimerazlar olarak adlandırılır (Tablo 1).

Tablo 1. Pektinazların Sınıflandırılması

Pektinaz çeşitleri	E.C. no	Substrat	Etki Şekli	Ürün
1. Esteraz				
(a) PME	3.1.1.11	Pektin	Hidroliz	Pektik asit+metanol
(b)PAE	3.1.1.6	Pektin	Hidroliz	Pektik asit+etanol
2. Depolimeraz				
(a)Hidrolazlar				
(i)Endo PG	3.2.1.15	Pektik asit	Hidroliz	Oligogalakturonadlar
(ii)Ekzo PG	3.2.1.67	Pektik asit	Hidroliz	Monogalakturonadlar
(b)Liyazlar				
(i)Endo PL	4.2.2.2	Pektik asit	Transeliminasyon	Doymamış oligogalakturanadlar
(ii) Ekzo PL	4.2.2.9	Pektik asit	Transeliminasyon	Doymamış digalakturanadlar
(iii) Endo PNL	4.2.2.10	Pektin	Transeliminasyon	Doymamış metiloligogalakturanadlar

Bu enzimlerin (pektinazların) oynadığı rol temel olarak genç bitki hücrelerinin orta lamelinde ve birincil hücre duvarında yapısal polisakkaritler olarak bulunan pektini parçalamaktır.

Pektin liyaz deneyi

Pektin liyaz enziminin aktivitesi, β -eliminasyon mekanizmasıyla 4,5-doymamış oligogalaktouranotların (konsantrasyonların hesaplanabilmesi için molar ekstinksiyon katsayısı $5.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) oluşmasından dolayı 235 nm'de optik yoğunluğun artmasıyla ölçülür (Albersheim, 1966). Bir indirgeme grubu yöntemi ile birlikte HPLC veya GC metotları ile ara ürün analizi yapılarak ayrıca viskozite azaltma yöntemi kullanılarak endo ve ekzo pektinazlar birbirinden ayrılabilir (Roboz *et al.*, 1952). Ayrıca doymamış üronik esterlerin 550 nm'de UV absorpsiyonuna sahip renkli bir ürüne dönüştürülmesine dayanan farklı bir yöntem de enzim aktivite tayininde kullanılabilir. Bu doymamış bileşiğin saptanması için tiyobarbitürik asitin (TBA), PNL aktivitesinin miktarının belirlenmesi için spesifik kolorimetrik ajan olduğu iddia edilmektedir (Nedjma *et al.*, 2001).

Pektin liyaz kaynakları

Günümüze kadar incelenen pektin liyazların çoğu mikroorganizmalardan saflaştırılmıştır. Bitki ve hayvanlarda da az miktarda var olduğu bildirilmiştir (Whitaker, 1990). Pektin liyazlar çoğunlukla mantar cinsi *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* tarafından üretilir, ayrıca bakteriyel ve maya pektin liyazları hakkında da birkaç rapor vardır.

Penicillium italicum CECT 2294 tarafından üretilen pektin liyaz, üretiminde kullanılan ortamın türünden (doğal ve sentetik) etkilenmiştir (Alana *et al.*, 1990). *Phaseolus vulgaris*'ten (Wijesundera *et al.*, 1984) izole edilen *Colletotrichum lindemuthianum*'un, sodyum polipektat ile kültürde veya *Phaseolus vulgaris*'in hücre duvarlarına sahip bir ortamda yetiştirildiğinde iki pektin liyaz formu ürettiği bulunmuştur. *Penicillium grieseoroseum*, maya ekstraktı ve sukroz (Baracat *et al.*, 1997), çay ekstraktı (Minussi *et al.*, 1996), metilksantin (Minussi *et al.*, 1997) ve şeker kamışı (Minussi *et al.*, 1998) içeren bir ortamda pektin liyaz üretebilir. Aşılardan salatalık meyvelerinde (Chen *et al.*, 1998) de yetişen *Pythium splendens* tarafından pektin liyaz enziminin üretildiği bildirilmiştir. Sıvı kültür ortamında *Rhizoctonia solani* AG 8 pektin liyaz aktivitesi gösterir (Brien and Zamani, 2003). Ayrıca *Lasidiopodia theobromae* ve *Penicillium* türlerinin pektin ile desteklenen sıvı kültür ortamında pektin liyaz enzimini ürettiği de bildirilmiştir (Adejuwon and Olutiola, 2007). *Pseudomonas fluorescens* E51, 12 g sukroz veya 15 mL gliserol ile desteklenmiş sıvı kültür ortamında pektin liyaz enzimini üretmiştir (Schlemmer *et al.*, 1987). Araştırmacıların bir kısmı, PNL üretiminin, hücrelerin UV radyasyona maruz bırakılmasıyla ya da ortama mitomisin C (MC), nalidiksik asit ya da bleomisin gibi DNA'ya zarar veren ajanların eklenmesiyle aktive edildiğini bildirmiştir (McEvoy *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1997; Nguyen *et al.*, 2002).

Pektik transeliminazlar için yeni uygulama alanlarının artması yüzünden üretimlerine olan talep de artmaktadır. Son zamanlarda yapılan araştırma makalelerine göre, bazı maya türleri tarafından pektin liyaz enziminin üretimi de rapor edilmiştir. Nakagawa *et al.* pektin liyaz enziminin hastalıklı meyvelerden izole edilmiş bir *psikrofilik* maya ile üretildiğini bildirmiştir (Nakagawa *et al.*, 2002). Soğukta aktif olan pektinolitik enzimler, gıda sanayisinde 5°C'nin altındaki meyve suyunun berraklaştırılması işleminde kullanılabilir. Yeni bir maya suşu olan *Debromyces nephalis*'in bir biyoreaktörde kullanılabilecek iyi bir pektin liyaz enzimi üreticisi olduğu varsayılmaktadır (Sathyanarayana and Kumar, 2006; Sathyanarayana and Kumar, 2008). Taze kirazlardan izole edilmiş endofitik bakteri suşunun, pektin liyaz enzimini ürettiği rapor edilmiştir (Sakiyama *et al.*, 2001).

Pektin liyaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu

Pektin liyaz enzimi, ticari pektik enzim preparatlarından mantar, bakteri ve maya kültür filtratlarından elde edilmiştir (Sathyanarayana and Kumar, 2006; Sathyanarayana and Kumar, 2008; Jong-Chon *et al.*, 1998). İlk pektin liyaz enzimi, DEAE selüloz ve Sefadex G-75 ve G-50 üzerinde kolon kromatografisi ile basit saflaştırma prosedürüyle pektinol R-10'dan saflaştırıldı (Alana *et al.*, 1989). *Penicillium italicum*'dan PL enzimini saflaştırmak için DEAE selüloz kromatografisi, CM-selüloz kromatografisi, fenil sefaroze CL 4B kromatografisi, Mono P-kromatografisi ve ardından ikinci defa fenil sefaroze kromatografisi kullanıldı (Martins *et al.*, 2002). *Pseudomonas fluorescens* W-51 tarafından üretilen bakteriyel pektin liyaz enzimi, konsantre kültür filtratı iyon değişim kromatografisi, metil-agaroz kolonu ve ardından bir fenil Sepharose CL 4B kolonu kullanılarak hidrofobik etkileşim kromatografisine tabi tutularak yüksek saflıkta elde edilmiştir (Schlemmer *et al.*, 1987).

Pektin liyaz enziminin yapısı

Aspergillus niger, N400 ve 4M-147'nin iki suşundan pektin liyaz A'nın (PNLA) kristal yapıları karakterize edilmiş, PNLA paralel bir β tabakasına katlanır ve yapı temelli ikili gruplar oluştuktan sonra %17'den fazla sekans benzerliği olmamasına rağmen pektat liyazın yapısal özelliklerinin birçoğunu paylaştığı gösterilmiştir (Mayans *et al.*, 1997). Pektat liyazın yapısal özellikleri, asparajin içeren amino asit dizilimi içermektedir. Bu iki PNL'nin aktif bölgelerinde aromatik aminoasitler bulunur ve negatif yüklü gruplarda bulunmaktadır. 182-187 rezidülerinin oluşturduğu döngüsel konformasyon PNLA yapısı için göze çarpan en büyük farklılıktır. (Vitali *et al.*, 1998).

Polipeptit omurgası, paralel β sarmalı konformasyonu olarak adlandırılan sağa doğru yay şeklinde katlanır. Çeşitli boyutlarda ve konformasyonlardaki bu motifin merkezindeki ve

dış kısmındaki yapılar farklı fonksiyonlar görmektedir. 53 rezidünün en büyük halkası, üç anti-paralel β dizisinden oluşan bir tur α sarmal ve bir tur sarmaldan oluşan küçük bir alana katlanır (Vitali *et al.*, 1998).

Pektin liyaz enziminin substrat spesifikliğı

Pektin liyaz enziminin spesifikliğini açıklamak için çok az sayıda araştırma vardır. Elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometrisi, *Aspergillus niger*'in PNLA'sının spesifikliğini ve aktivitesini belirlemede kullanılmıştır (Mutenda *et al.*, 2002). Değişken derecelerdeki model pektinleri ve farklı metil ester modellerini kullanarak, PNLA'nın, substrat olarak daha çok metil ile daha fazla esterleşmiş olan pektinleri tercih ettiğı ve esterleşme derecesi azaldıkça aktivitesinin önemli ölçüde azaldığını gözlemlemişlerdir. *Penicillium canescens*'in pektin liyaz aktivitesinde metilasyon derecesinin etkisi bu bulguyu desteklemiştir (Nakagawa *et al.*, 2005). Bu durumda, esterleşme derecesi azaldıkça kataliz gücünde düşer. PNLA'nın aktivitesi, substratın metil esterifikasyon derecesine (DM) bağlıdır (Voragen, 1972). Bununla birlikte, ortalama DM'ye sahip polimerik bir substrat, metil esterlerin dağılımının pektin liyaz enziminin aktivitesini belirlediğı çok heterojen bir substrattır. Metil esterleşmesinin yokluğu veya varlığı PNLA tarafından substrat tanınmasında önemli bir rol oynar (Ralet *et al.*, 2001). Metil esterlerin uzaklaştırılması, PNLA aktivitesinin tamamen kaybedilmesine neden olur. Bir metil ester yerine etil ester veya amid fonksiyonel gruplarının eklenmesi PNLA aktivitesinin kaybına sebep olur. Aktivitedeki bu değişikliğin sebebi etil esterinin hidrofobik ceplere tam olarak giremeyecek kadar büyük olmasıdır. Metil esterlerin çıkarılması, negatif yönde yüklü bir substrat üretir. Negatif elektrostatik ortamın varlığı nedeniyle, böyle bir substrat muhtemelen itilecektir. Hidrofobik amidatlı oligoGalpA itilmez ve substrat bağlama yarığına girebilir. Bununla birlikte, bu substratlar kullanılarak hiçbir ürün elde edilememiştir. Sonuç olarak, enzim-substrat kompleksi meydana gelmez ve bu bileşikler inhibitör görevi yapabilir. Bu bulgular, pektin liyaz aktivitesi için yüksek derecede metil esterifikasyona sahip katı substrat gereksinimi olduğunu göstermiştir (Mayans *et al.*, 1997).

Pektin liyaz enziminin moleküler biyolojisi

Belirli bir enzimi kodlayan bir geni izole etme işlemi, uygun ekspresyon vektöründe klonlamadan sonra ekspresyon için önemlidir. Pektin liyazı kodlayan gen, çok sayıda genden oluşan bir multigen ailesine aittir ve bu nedenle, tüm genleri klonlamak ve pektin liyazı ekspresyonunu etkileyen faktörü araştırmak önemlidir. Pektin liyaz gen ekspresyonu üzerine önemli çalışmalar yapılmış ve bunların çoğı *Aspergillus sp.*'den olmasına rağmen pektin

liyaz genleri ayrıca farklı organizmalardan da klonlanmıştır. Pektinaz genlerinin ekspresyonu, genellikle transkripsiyon seviyesinde, ortamın pH'sı ve karbon kaynakları gibi çevresel koşullar ile düzenlenir, genellikle pektin ve pektik bileşenler tarafından indüklenir ve glikoz tarafından bastırılır (Lahiani and Gargouri, 2007). Pektinaz gen ekspresyonunu kontrol eden düzenleyici yollar, özellikle *Erwinia* bakterisinde fitopatogenik bakterilerde iyi incelenmiştir, mantar pektinazlarının düzenlenmesi hakkında çok az bilgi vardır. *Erwinia* türleri tarafından bitkilerde veya bitki organlarında yumuşak çürüklüğün oluşturulması, büyük ölçüde organizmaların hücre dışı enzimleri olan, özellikle pektat liyaz (Pel), poligalakturonaz (Peh) ve pektin liyaz (PL) gibi pektinazlar üretme kabiliyetine bağlıdır (Rouanet *et al.*, 1999). Bu enzimler, bitki hücre duvarı bileşenlerini parçalayarak doku maserasyonunda rol oynar. Farklı büyüme koşulları altında 26 pektinolitik genin *Aspergillus*'tan ekspresyon profili incelenmiştir (Pirhonen *et al.*, 1991). Pektin, poligalakturonik asit ve D- galakturonik asidin, poligalakturonaz, pektin liyaz ve pektin metil esteraz kodlayan genlerin ekspresyonunu indüklediği, glukozun ise bu genlerin ekspresyonunu baskıladığı görülmüştür. Bir promotör silme çalışmaları gen ekspresyonu aktivasyonuna katılan 5'-TYATTGGTGGAA-3 (sıklıkla PG benzeri) pektinaz korunmuş sekansların mevcudiyetini ortaya koymuştur ve CCCTGA tanımlanmıştır (Visser *et al.*, 2004; , Benen *et al.*, 1996).

Erwinia'da pektin liyaz (PL) üretimini indükleyen mitomisin C (MC), nalidiksik asit veya UV ışığı gibi DNA'ya zarar veren ajanlar oldukça dikkat çekici aktivatörlerdir (Kamimiya *et al.*, 1972; Tsuyumu *et al.*, 1985). Ayrıca, *Erwinia*'da *carotovora subsp. karotovora* suşu 71, PL üretimi, karotovorisin sentezi (Ctv) ve hücre parçalanması (Lss) ile birlikte indüklenir (Chatterjee *et al.*, 1991).

Biyoteknolojik uygulamalar

Pektin liyazlar, yüksek oranda esterleştirilmiş pektinleri (meyvelerde bulunanlar gibi), normalde ticari ürünlerde bulunan PG ve PE kombinasyonunun aksine, metanol üretmeden β -eliminasyon mekanizması yoluyla küçük moleküller halinde parçalayabilen bilinen tek pektinazlardır (Whitaker, 1990). Metanol sağlık açısından tehlikeli ve toksik bir maddedir. Metanol, meyve suyu konsantrasyonu sırasında buharlaşarak kaybolabilir, ancak viskoz malzemelerde (Püreler, bebek mamaları, vb.) veya konsantre olmayan meyve sularında, pastörizasyon sırasında metanolün sadece kısmen açığa çıktığı farklı bir durum meydana gelir. Ticari pektinazlarda gıda endüstrisinde kullanımı istenmeyen enzimatik aktivitenin varlığı, gıda aroması için zararlı olabilir (Taragano and Pelosof, 1999).

Alkali pektinazların, meyve sularının asidik pH değeri nedeniyle gıda endüstrisinde kullanılması uygun değildir. Ancak, tekstil endüstrilerinde çok büyük rağbet görürler (Cao *et al.* 1992; Bruhlmann *et al.*, 2000; Kapoor *et al.*, 2001).

Enzim İmmobilizasyonunun Tarihçesi

İmmobilize enzimlerin tarihsel gelişimi üç basamakta görselleştirilmiştir (Tablo 2). İlk adımda, 19. yüzyılın başlarında, immobilize mikroorganizmalar deneysel temellerde endüstriyel olarak kullanılıyordu. Bu deneysel çalışmalar sirkenin mikrobiyal üretimi (bakterilerle büyümüş odun talaşı üzerine alkol içeren çözelti damlatmak suretiyle) ve atık su arıtımı için damlatma filtresinin veya süzülme işleminin geliştirilmesidir (Hartmeier, 1988).

Modern immobilizasyon tarihçesi 1940'lı yıllarının sonlarına kadar devam etmiş fakat bu çalışmalar farklı disiplin dergilerinde yayınlandığı için çok ilgi çekmemiştir (Trevan, 1980). 1960 yıllarında günümüzdeki teknolojilerin temeli atılmış çok fazla yayın artışı gerçekleşmiştir (Tosa *et al.*, 1966). İkinci aşamada, sadece immobilize edilmiş tek bir enzim reaksiyon için kullanıldı, ancak 1970'lerde kofaktör rejenerasyonu ve canlı hücrelerle iki enzim reaksiyonu dahil olmak üzere daha karmaşık sistemler geliştirilmiştir (Brodelius *et al.*, 1987). Bunların bir örneği olarak, L-amino asit dehidrojenaz ile stereoselektif indirgeyici aminasyon ile α -keto asitlerden L-amino asitlerinin üretimidir. Bu yöntem, nikotinamid adenin dinükleotidi (NADH)'nin tüketimini ve ikinci enzim format dehidrojenaz tarafından katalizlenen reaksiyonda NAD⁺'nin NADH'ye indirgenmesiyle birlikte formik asidin enzimatik oksidasyonu ile karbondioksitle aminin birleştirilmesiyle koenzimin yenilenmesini içerir.

Tablo 2. İmmobilize Enzimin Gelişmesindeki Adımlar

Adım	Tarih	Kullanım alanı
1	1815	Asetik asit ve atık su arıtma gibi işlemlerde deneysel kullanım
2	1960'lar	Tek enzim immobilizasyonu: L-aminoasitlerin üretimi, glukozun izomerasyonu
3	1985-1995	Kofaktör rejenerasyonunu içeren çoklu enzim ve hücre immobilizasyonu: membran reaktörlerinde keto asitlerden L-aminoasitlerin üretimi

İmmobilize edilmiş bir enzim sisteminin ana bileşenleri, enzim, matriks ve enzimin matrikse bağlanma şeklidir.

Enzim İmmobilizasyonu

Enzimlerin tartışmasız avantajlarına rağmen kullanımlarında bazı problemlerle karşılaşılabilir. Enzimlerin izolasyonu ve saflaştırılması maliyeti, doğal ortamlardan izole edildiklerinde yapılarının kararsızlığı ve serbest enzimlerin reaksiyon ortamından uzaklaştırılamaması enzimatik proseslerde maliyet olarak karşımıza çıkmaktadır. Bazı proseslerde serbest enzimler reaksiyon ortamından uzaklaştırılamadığı için inhibitör kullanılmaktadır. Kullanılan inhibitörler oluşan ürünlerin kirlenmesine ve aktif formda enzimlerin yeniden kullanım için reaksiyon ortamından geri kazanılmasına engel olur.

Bu sınırlamaların üstesinden gelmek için immobilize enzim teknolojisi başarılı bir şekilde çeşitli yöntemler sunmaktadır. İmmobilizasyon; enzimlerin katı destek materyallerine sabitlenmesiyle gerçekleştirilir, bunun sonucunda heterojen immobilize enzim sistemleri elde edilir. Sistemler, çoğu durumda enzimlerin hücresel zarlara bağlandığı canlı hücrelerde meydana gelen doğal oluşumunu taklit ederek, enzimlerin yapısını dolayısıyla da onların faaliyetlerini dengeler. İmmobilize enzim serbest enzimle kıyaslandığında immobilize enzimler çevresel şartlara karşı daha dayanıklıdır. İmmobilize enzim sistemlerinin heterojen yapısı tekrar kullanım, ürün ve enzimin geri elde edilmesini ve çok çeşitli biyoreaktör dizaynını sağlar.

Enzimler, çeşitli yöntemlerle immobilize edilebilir, destek ile enzim arasında zayıf etkileşimler varsa fiziksel yöntem olarak, destek ile enzim arasında kovalent bağlar oluşuyorsa kimyasal yöntem olarak sınıflandırılabilir (Bullock, 1995; Woodley, 1992; Chaplin *et al.*, 1990; Kennedy *et al.*, 1983). Fiziksel immobilizasyon yöntemleri: (i) bir membran reaktör içinde enzim içermesi, (ii) suda çözünmeyen bir matris üzerinde adsorpsiyon (fiziksel, iyonik), (iii) dahil etme (veya jel sıkışması), (iv) katı bir membran ile mikroenkapsülasyon, (v) sıvı bir zar ile mikroenkapsülasyon ve (vi) enzimatik Langmuir-Blodgett filmlerinin oluşumudur. Kimyasal immobilizasyon yöntemleri : (i) suda çözünmeyen bir matrise kovalent bağlanma, (ii) çok işlevli, düşük moleküler ağırlıklı ajanların kullanılmasıyla çapraz bağlama ve (iii) proteinler gibi diğer nötr maddelerle birlikte çapraz bağlamadır. Yukarıda listelenen yöntemlerin yanı sıra immobilizasyon için kombine sistemler veya yeni metotlarda geliştirilmiştir. Ayrıca, her enzim için aynı metodu kullanmak ve tek bir destek materyali kullanmak efektif değildir. Bunun nedeni, geniş ölçüde farklı kimyasal özellikler ve enzimlerin bileşimi, substratların ve ürünlerin farklı özellikleri ve ürünün farklı kullanımlara göre dizayn edilmesidir. Her yöntemin avantajı olduğu gibi dezavantajları da mevcuttur. Bu yöntemlerden olan adsorpsiyon kolay, ucuz fakat geri dönüşümlü bir yöntemdir. Kovalent ve çapraz bağlama metodu ise etkili bir yöntem olmasına karşın enzim

destek materyaline aktif bölgesinden bağlanırsa aktivite kaybı olur. (Tischer *et al.*, 1999; Scouten *et al.*, 1995). İmmobilize enzim serbest enzimle karşılaştırıldığında, aktivitenin düştüğü ve Michaelis sabitini arttırdığı görülmüştür. Bu değişimin birinci sebebi, enzimde meydana gelen yapısal değişiklikler ve enzimin çalışma ortamının değişmesidir. İkincisi, meydana gelen reaksiyona, desteğin yapısına ve reaktörün tasarımına büyük ölçüde bağlıdır. Ayrıca, iki fazlı sistemler olduğu için, immobilize edilmiş enzim sistemleri, kaçınılmaz kütle transfer sınırlamaları vardır ve bunların toplam katalitik performansları üzerinde olumsuz etkileri oluşmaktadır. Ancak bunlar uygun reaktör tasarımları geliştirilerek azaltılabilir.

Ticari uygulamalarda enzimlerin veya kimyasal katalizörlerin seçilmesi, serbest ve immobilize sistemlerin kullanılması çevresel faktörler sağlık ve maliyet dikkate alınmalıdır.

Destek materyalinin seçimi

Matriksin özellikleri, immobilize edilmiş enzim sisteminin performansını belirlemede büyük öneme sahiptir. İdeal destek materyalinin özellikleri, fonksiyonel grupların olması, fiziksel, kimyasal, biyolojik kararlılık, hidrofiliklik, çözünmezlik, biyouyumluluk, yüksek tutuculuk, geçirgenlik, zehirsizlik, mikrobiyal saldırıya karşı direnç, mekanik dayanıklılık ve düşük maliyettir (Trevan, 1988; Brodelius *et al.*, 1987; Buchholz *et al.*, 1987)

Destek materyalleri bileşenlerine göre organik ve inorganik olarak sınıflandırılır. Organik destek materyalleri doğal ve sentetik polimerler olarak ayrılır. Destek materyallerinin fiziksel özellikleri immobilize sistemlerin aktivitesi için önem taşımaktadır ve reaktör seçimini belirlemektedir. Özellikle, gözenek parametreleri ve partikül büyüklüğü toplam yüzey alanını belirler ve böylece enzimlerin bağlanma kapasitesini önemli derecede etkiler. Gözenekli olmayan destekler az miktarda yayılma sınırlaması gösterir ancak düşük bir yükleme kapasitesine sahiptir. Bu nedenle, gözenekli destekler genellikle tercih edilir, çünkü yüksek yüzey alanından dolayı daha yüksek bir enzim yüklemesine izin verir ve immobilize olan enzim çevreden daha fazla korunur. Gözenekli destekler, kapasite ve akış özelliklerini optimize etmek için kontrollü bir gözenek dağılımına sahip olmalıdır. İnorganik taşıyıcıların birçok avantajına rağmen (örneğin, fiziksel, kimyasal ve mikrobiyal bozulmaya karşı yüksek stabilite), endüstriyel uygulamaların çoğu organik matrikslerle gerçekleştirilir. Hidrofilik karakter, immobilize bir enzimin aktivite seviyesini belirleyen en önemli faktörlerden biridir (Gemeiner, 1992).

Yaygın olarak kullanılan mükemmel bir matriks agarozdur. Agarozun bir matriks olarak kullanılmasının diğer bazı avantajları arasında hidrofilik karakter, türevlendirme, yüklü grupların bulunmaması ve ticari temin edilebilirlik sayılabilir. Bununla birlikte, agaroz ve

diğer gözenekli desteklerin kullanımında önemli bir sınırlama yüksek maliyettir. Bu sorun, matriks yenilenmesine ve yeniden kullanılmasına izin veren geri dönüşümlü yöntemler kullanılarak çözülebilir. Enzimler, tersinir fiziksel adsorpsiyon ve iyonik bağlantılardan kararlı kovalent bağlara kadar değişen etkileşimler yoluyla desteğe bağlanabilir. Enzim immobilizasyon yöntemleri geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz yöntemler olarak iki kategoriye ayrılır (Gupta, 1992). Bağlanmanın kuvveti genellikle geri dönüşüm ile ters orantılıdır. Bu iki çelişen stabilite ve geri dönüşümlülüğü eş zamanlı olarak yerine getirmek zordur. Geleneksel yaklaşımda bağın mümkün olduğu kadar güçlü kılmak ve tersinirliği feda etmek olmuştur.

İmmobilize enzimlerin özellikleri

Enzim immobilizasyonunun bir sonucu olarak, enzim molekülünün katalitik aktivitesi veya ısıl stabilitesi gibi bazı özellikleri değişmektedir (Hartmeier, 1988; Trevan, 1980). Özelliklerin bu modifikasyonu ya immobilize enzimin asıl aktivitesinde değişikliklere ya da immobilize enzim ve substrat arasındaki etkileşim bulk solüsyondan farklı olan mikro çevrede meydana gelir. İmmobilizasyondaki katalitik özelliklerdeki gözlemlenen değişiklikler enzimin matrikse bağlanmasına neden olan proteinin üç boyutlu yapısındaki değişikliklerden kaynaklanabilir. Bu etkiler kanıtlanmış ve bir dereceye kadar sınırlı sayıda enzim sistemi için kullanılmıştır.

Enzim immobilize edildiğinde stabilitesi artar. Bu nedenle stabilizasyon kavramı, enzimleri immobilize etmek için önemli bir itici güç olmuştur. Pek çok durumda, gözlemlenen operasyonel stabilizasyon genellikle işlemin difüzyonunu kontrollü hale getiren aşırı bir enzim yüklemesinin sonucudur. Ancak, moleküler seviyede gerçek stabilizasyonun gösterilmesi proteinlerin kovalent olarak immobilize edilmesiyle olur. Farklı yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalar, stabilizasyon ile matrikse kovalent bağ sayısı arasında bir korelasyon olduğunu göstermiştir. İmmobilize edilen enzimlerin kullanımıyla ilişkili ana problemlerden biri, özellikle enzimler makromoleküler substratları ile arasında gösterilen katalitik aktivitenin kaybolmasıdır. Substratın enzimin aktif bölgesine sınırlı erişimi nedeniyle, substratın sadece erişilebilir yüzeydeki gruplara ulaşması sonucu aktivite düşebilir. Bu sterik engel, makromoleküler substrattan türetilen ürünlerin karakteristik düzenini değiştirebilir. Bu sterik engellerden uzaklaşmak için, izole makromoleküler zincir ağlarından oluşan desteklerin seçimi, hidrofilik ve inert ara kol bağlantılarının kullanılması immobilizasyonu yapılacak enzimin rezidülerinin dikkatli seçilmesi gereklidir.

Enzim immobilizasyonunun biyolojisi

Her ne kadar enzim immobilizasyon araştırmaları, teknik faydalarının sonuçları olarak geliştirildiyse de, yzeylere bağlı enzimlerin bulunmasının avantajlarının, omr boyu var olduğu srece canlı hcrelerce kullanıldığı kabul edilmelidir. Enzim immobilizasyonunun biyolojik rolzyle ilgili bir araştırma, biyoteknoloji uzmanları iain bazı dersler sağlayabilir ve tamamen kimyasal olanın yanı sıra ikinci bir ıkıkış noktası gzevi grrr. Aslında, immobilize edilmiş enzimin durumun doğal ortamlarında enzimler iain en yaygın durum olabileceğine dair deneysel kanıtlar vardır. Enzimlerin uygun yzeye bağlanması, faaliyetlerinin gerekli olduğu yerde kalmalarını sağlar. Bu immobilizasyon, uygun yerdeki konsantrasyonu arttırır ve ayrıca enzimi tahrip olmaktan koruyabilir. Çok molekzllz immobilizasyon normal olarak zayıf kovalent olmayan kuvvetlere ve hidrofobik etkileşimlere, ancak bazen de kovalent bağlara (orneğin diszlfzr kzprzleri) bağlıdır. Bztzn bu farklı kuvvetler, immobilize enzimlerin geliştirilmesinde kullanılmıştır.

Hibrit Nano Yapılar

2000'li yılların başlarında yeni nanomalzemelerin araştırmalarından bu yana, çekirdek ve kabuk yapısı (Schart, 2000) ve Janus partikzllz (Lattuada and Hatton, 2011) gibi bzzyleyici morfolojileri olan çeşitli nanomalzemeler geliştirilmiştir. Bu yeni nanoyapılar arasında, nanoçiçeklerin topografik ozellikleri, bilim insanlarının ilgisini çekmiştir. zknz kzresel nanopartikzllere kıyasla daha yzsek yzzey/hacim oranına sahip olduğundan dolayı yzzey reaksiyonlarının etkinliğinin artmasında faydalıdır.

Enzimler, mzkemmel aktiviteye ve substrat spesifikliğine sahip biyolojik molekzllerdir, ancak kullanımları, çevreye duyarlılık, deneysel sonuçların tekrarlanabilirliği ve karmaşık saflaştırma işlemlerinin gerekliliği gibi bazı dezavantajlarla sınırlıdır. İlaç dağıtım sistemlerinde veya dedektzrlerde uygulamayı kolaylaştırmak iain “nanobiyomalzemeler” adı verilen yeni nanomalzemeler geliştirilmiştir. Bunlar aynı zamanda “organik-inorganik hibrit nanomalzemeler” olarak da bilinir; inorganik nanoparacak bileşenler organik malzemelere bağlandığında bu isimle adlandırılırlar. Nanobiyomalzemelerin hazırlanması iain mevcut immobilizasyon yzntemleri adsorbsiyon, konjugasyon (Boyer et.al., 2007), çapraz bağlama (Yan et.al., 2006) ve self assembly (Shen et.al., 2010) kullanılmaktadır.



Şekil 7. Nanomalzemelere immobilizasyon teknikleri

Nano-biyomalzemeler kataliz, biyosensörler ve ilaç dağıtımında sayısız potansiyel uygulamaya sahiptir. Enzimlerin yapısında iki farklı grup bulunmaktadır. Bunlardan biri protein diğeri ise kofaktördür. Metal iyonları kofaktör olarak güçlü bir afiniteye sahiptir ve bu nedenle, proteinlerin stabilitesi yük afinitesi, kovalent bağ ve yapısal eşleşme gibi etkileşimle metal yüzeye immobilizasyon sırasında genellikle arttırılır. Bununla birlikte, immobilize edilmiş proteinler, temel olarak immobilizasyon işlemi sırasında oryantasyonunu değiştirerek ve katı destekler üzerindeki kütle transferi sınırlamaları nedeniyle aktivitelerinin kaybindan dolayı serbest enzimden daha düşük aktivite sergileyebilirler (Kim *et al.*, 2008). Tek proteinli nanopartiküller ve nanojeller, yüksek oranda korunmuş aktiviteleri olan katalizörler olarak kullanılan yeni nano-biyomalzemelerin örnekleridir (Yan *et al.*, 2007) Bu nanopartiküller ve nanojellerdeki enzimlerin aktivitesi, serbest enzimlerinkinin ~%60-90'ı kadar olabilir. Aktivitenin serbest enzimden daha iyi olduğu birkaç örnekte, mesoporoz silikaya gömülü organofosfor hidrolaz, serbest hidrolaz ile karşılaştırıldığında çözeltide ~%200 bir aktivite göstermiştir (Lei *et al.*, 2002).

Nanoçiçek üzerinde yapılan araştırmalar günümüzde, organik, inorganik malzemelerden basit sentez yöntemi ve bazen yüzey reaksiyonunun stabilitesini ve verimliliğini arttırmak için hem organik hem de inorganik malzemelerin bir kombinasyonu olmaları nedeniyle ilgi çekmektedir. Son zamanlarda, geleneksel yöntemlerin sınırlarının üstesinden gelmek için hibrit nanomalzemelerin kolay ve güvenli sentezi için yeni bir yaklaşım geliştirilmiştir (Ge *et.al.*, 2012). Çünkü bu sentetik yöntemler için toksik element veya aşırı zor şartlar gerektirmediğinden metal iyon çözeltisine sadece protein ekleyerek hibrit nanomalzemenin sentezi mümkündür. Bu nedenle, senteze katılan organik madde, immobilize

edilmiş enzimin aktivitesini korumak için diğer geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında daha az işleme tabi tutulur. Bu işlemle üretilen çiçek benzeri hibrit nanomalzemeler “organik-inorganik hibrit nanoçiçekler” veya “hibrit nanoçiçekler” olarak adlandırılır. Sentez mekanizmaları, fiziksel özellikleri, protein aktiviteleri, stabiliteleri ve tekrar üretilebilirlikleri incelendiğinde sentezlenen bu yapılar serbest enzimlerden daha iyi özelliklere sahiptir.

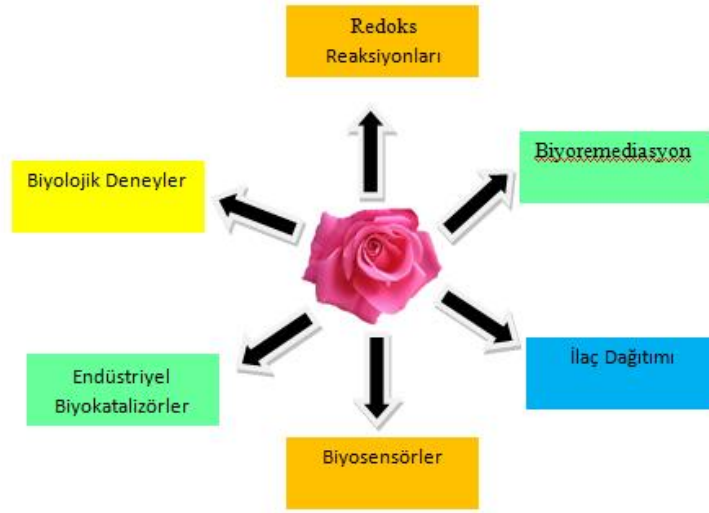
Hibrit nanoçiçeklerin avantajları;

- Nanoçiçekler, reaksiyonların kinetiğini hızlandırarak yüzey adsorpsiyonunu arttırmak için yüksek yüzey/hacim oranını gösterir.
- Nanoçiçekler, geniş yüzey alanlarından dolayı daha iyi yük transferi ve destek materyaline daha iyi immobilizasyon gerçekleşir
- Yüzey reaksiyonunun etkinliği, nanoçiçeklerin 3D yapısından dolayı artar.
- Nanoçiçeklerin hazırlanması için iyonotropik jelleşme, çökeltme yöntemi ve yeşil sentez gibi yöntemler basit, toksik olmayan ve uygun maliyetlidir (Zhang *et al.*, 2016)
- Proteinlerin ve enzimlerin kararsızlığı nedeniyle, metallerin yüzeyinde immobilizasyon stabiliteyi artırır.

Dezavantajları ise;

- Nanoçiçeğin yaprakları ve boyutları gibi yapısal özelliklerini, reaksiyon sırasında ve tamamlanmasında kontrol etmek çok zordur (Lee *et al.*, 2015)
- Sentetik reaksiyonlarda, nanoçiçekler, toksik elementlerin veya yan ürünlerin oluşabileceği 80-550°C gibi aşırı koşullarda hazırlanır (Kharisov, 2008).
- Protein ve peptit immobilizasyonu nedeniyle, terapötik aktiviteleri serbest formlara kıyasla azalır.

Nanoçiçeklerin uygulama alanları Şekil 8’de verilmiştir.



Şekil 8. Nanoçiçeklerin uygulama alanları

Nanoçiçeklerin türleri

Hibrit nanoçiçeklerin bakır-protein, kalsiyum-protein, manganez-protein hibrit nanoçiçekleri, bakır-DNA hibrit nanoçiçekleri ve kapsüler hibrit nanoçiçekleri gibi beş temel çeşidi vardır.

Bakır (II) iyonları ve proteinler kullanılarak sentezlenen nanoçiçekler

Bakır (II) iyonları ve proteinlerden oluşan hibrit nanoçiçeklerin ilk gelişmesinden bu yana, bu türlerin verimlilik ve kararlılıklarına odaklanarak yoğun bir şekilde çalışılmıştır (Ge *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2014). Çünkü bakır-protein hibrit nanoçiçekler diğer hibrit nanoçiçeklerden daha çok araştırılmıştır. Bu yüzden sentez mekanizmaları ve uygulamaları daha iyi anlaşılmıştır.

Ge *et al.* 2012 yılında hibrit nanoçiçekleri rastlantı eseri bulmuştur ve etkileşim yoluyla bakır iyonu-protein partikülünün yeni bir çeşidini bulduğunu doğrulamıştır. Daha sonra α -laktalbümin, lakkaz, karbonik anhidraz ve lipaz enzimini kullanılarak dört tip hibrit nanoçiçekler sentezlenmiştir. Sentezlenen bu hibrit nanoçiçekler, fenollerin tespitinde ve katekolaminlerin oksidasyonunda kullanılmıştır. Hibrit nanoçiçeklerin verimi geleneksel serbest enzimden (%95-650) daha üstündür. Hibrit nanoçiçeklerin verimi aşağıdaki faktörlerin etkileşiminden kaynaklanmaktadır:

- (i) nanoçiçeklerin kütle transfer sınırlamalarına neden olmayan geniş yüzey alanı;
- (ii) sıkıştırılmış enzim moleküllerinin ortak etkileşimi
- (iii) enzimin karşılıklı etkisi ve her birisi metal iyonu içeren nanoçiçeklerin mikro çevresi (örneğin, nanoçiçeklerde Cu^{2+} iyonları lakkazın verimini artırabilir.)

Ayrıca, araştırmacılar, lakkaz enzimi adsorbe edilmiş hibrit nanoçiçekleri içeren bir şırınga filtresini basitleştirilmiş bir fenol dedektörü olarak geliştirmişlerdir. Kısaca, sulu fenol ve 4-aminoantipirin karışımı, bir şırınga kullanılarak nanoçiçek kaplı filtreye enjekte edilmiş ve 5 dakika boyunca filtre haznesinde tutulmuştur. Lakkaz enzimi bağlı nanoçiçeklerin yüksek aktivitesi antipirin boyaları üretmek için fenolün 4-aminoantipirin ile hızlı oksidatif etkileşimini sağlamıştır. Son kırmızı çözelti şırınganın dışına itilmiş ve çıplak gözle görselleştirme veya UV/VIS spektrofotometre kullanılarak analiz için toplanmıştır. Bu yöntemin tespit oranı önceden var olan gaz kromatografisi (GC) veya sıvı kromatografisinden (LC) daha hızlıdır. Bu yöntem ayrıca, parçacıklardaki enzimin yüksek stabilitesinden dolayı temizleme yoluyla filtrenin yaklaşık 1 ay boyunca tekrar kullanılmasına olanak sağlamıştır.

Sun *et al.* 2014 yılında tek bir hibrit nanoçiçekte iki veya daha fazla enzimin bulunabileceğini göstererek glikoz oksidaz (GOx) ve yaban turpu peroksidazını (HRP) kullanarak multienzim hibrit nanoçiçekleri sentezlemişlerdir. Günümüze kadar birçok enzimin immobilizasyonu kovalent çapraz bağlama (Manesh *et al.*, 2010), kapsülleme (Delaittre *et al.*, 2009) ve translasyon sonrası enzim konjugasyonu (Hirakawa *et al.*, 2007) nispeten karmaşık işlemlerle gerçekleştirilir. Fakat bu teknikler zaman alıcıdır veya hibrit malzemelerin uygulanmasını sınırlandıran enzimatik aktivitenin azalması ile sonuçlanır. Buna bir alternatif olarak nanoçiçeklerin keşfi hızlı ve basit bir sentez mekanizması sunar. Bu deneyde kullanılan prosedür aşağıdaki gibidir: GOx tarafından okside edilen glikoz, HRP tarafından hemen 3,3',5,5'-tetrametilbenzidini (TMB) oksitlemek için katalizlenen H₂O₂'yi üretir; bunun sonucunda renk berrakdan maviye döner. Geleneksel iki aşamalı işlem genellikle, glukoz oksidasyonundan üretilen H₂O₂ dağılımı nedeniyle düşük verimle gerçekleşir. Bununla birlikte, hibrit nanoçiçeğinde, üretilen H₂O₂ kaybı azaltılabilir çünkü GO_x ve HRP eşzamanlı olarak bulunur, bu da daha doğru sonuç gösterir.

Tripsin hibrit nanoçiçekler ilk kez Lin ve arkadaşları tarafından gelişmiş protein analizi için kullanılmıştır (Lin *et al.*, 2014). Proteomik analizlerde yaygın olarak kullanılan kütle spektrometresi (MS), asıl protein yapısındaki enzimatik olarak parçalanmış peptit bağlarının analizlerini içerir. Bu nedenle, etkili proteoliz, proteinlerin etkin bir şekilde tanımlanması için anahtar bir adım olarak gereklidir. Genel olarak, proteoliz, serbest enzimler kullanılarak gerçekleştirilir ve uzun parçalanma süresi, otoliz, çevresel değişikliklere karşı düşük stabilite ve ürünlerin zor geri kazanılması gibi bazı sınırlamalara neden olur. Bu dezavantajların üstesinden gelmek için katı destek materyallerine yani enzimlerin immobilizasyonuna ihtiyaç vardır. Tripsin nanoçiçekleri ilk olarak Lin ve arkadaşları tarafından yüksek proteolitik performans, iyi enzim stabilitesi ve tekrar kullanılabilirlik ve

kısa parçalanma süresi elde etmek için immobilize enzim olarak kullanılmıştır (Lin *et al.*, 2014). Ayrıca, hibrit nanoçiçeğin enzim bileşeninin etkinliği çeşitli geleneksel protein analizlerinin sonuçları ile karşılaştırılabilir. Olumlu sonuçlar, hibrit nanoçiçeğinin, proteomik analiz için umut verici bir enzim sistemi olduğunu göstermektedir.

Hidrojen peroksit ve fenolün görsel tespiti için bakır iyonları ve HRP kullanan bir hibrit nanoçiçeği sentezlenmiş (Lin *et al.*, 2014). Yukarıdaki gibi, hibrit nanoçiçeği, 4-aminoantipirinin varlığında hidrojen peroksit ve fenol reaksiyonunda bir katalizör olarak kullanmışlardır. Çözelti rengindeki değişiklikler, çıplak gözle bile 0,5 μM hidrojen peroksit ve 1 μM fenol kadar düşük konsantrasyonlarda tespit edildiğini göstermiştir.

Kalsiyum (II) iyonları ve proteinler kullanılarak sentezlenen nanoçiçekler

Birçok nanoçiçekler bakır iyonları ile sentezlense de kalsiyum iyonları ile oluşturulan nanoçiçekler de araştırılmıştır. Kalsiyum fosfat kristalleri kullanan bir nanoçiçek, bakır nanoçiçeklerin sentezi için kullanılan aynı yöntemle Wang ve arkadaşları tarafından sentezlenmiş (Wang *et al.*, 2013). Çiçek benzeri morfoloji onaylanarak enzim immobilizasyon prosedürü nedeniyle aktivitenin nasıl arttığına dair bir varsayım sunmuşlar. Bu deneyde kullanılan α -amilaz allosterik olayları gösteren bir enzimdir. Kalsiyum iyonlarının yokluğunda α -amilaz fonksiyonel tarafı inhibe olarak inaktif durumdadır. Buna karşılık, kalsiyum iyonlarının varlığında α -amilazın allosterik bölgeleri kalsiyum iyonu tarafından işgal edilir, böylece fonksiyonel gruplarının yapısını etkiler.

Kalsiyum iyonları ve α -amilaz kullanılarak hibrit nanoçiçeğinin sentezi sırasında, kalsiyum iyonları aktive olur ve α -amilaza kuvvetle bağlanır. Çünkü iki element hibrit nanoçiçeklerin oluşumu sırasında birbirine yakın yerleştirildiğinden kalsiyum iyonlarıyla rastgele aktive edilen serbest α -amilaz enziminden daha uzun süre aktif kalmıştır. Böylece, Wang ve arkadaşları proteinin belirli bir ortamda işlevselliğini geliştirmek için protein ve nanomalzemeler arasındaki kimyasal etkileşimi anlamının çok önemli olduğunu göstermişlerdir (Wang *et al.*, 2013)

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, kalsiyum iyonları kullanan bir hibrit nanoçiçek yapısı sunulmuştur. Protein çözeltisini kullanan önceki sentez yöntemlerinden farklı olarak, iyonik bağlanma yoluyla bir jel biçimli kompozitin üretimi için kitosan (CS) ve tripolifosfat (TPP) kullanılmıştır. Bu yöntem her ne kadar Hou ve arkadaşları tarafından önerilen metottan farklı adımlar içerse de nanoçiçeklerin oluşum mekanizması aynıdır (Wang *et al.*, 2013). Kalsiyum iyonları ve TPP kalsiyum fosfat kristallerini oluşturur ve nanoçiçek bu kristallerin ve CS-TPP jel kompleksinin reaksiyonuyla elde edilir. Bu deneyde hemen hemen her tür

katalizör kullanılabilir, çünkü katalizör elektrostatik etkileşimle CS-TPP jel kompleksinde kitosan ile birleşir. Bununla birlikte, katalizörün eklenmesi kalsiyum fosfat oluşumu için çekirdeklenme bölgelerinde azaldığı için, nanoçiçeğin oluşumu için maksimum katalizör miktarının 5,0 mg olduğu belirtilmektedir. Nanoçiçek sentezi için bu teknik, çeşitli organik maddeler kullanarak nanoçiçeklerin oluşumunu kolaylaştıran yeni bir yaklaşım sağlar.

Manganez (II) iyonları ve proteinler kullanılarak sentezlenen nanoçiçekler

Mangan fosfat hibrit nanoçiçekleri, insanlar tarafından tüketilen akut zehirlenmeye neden olabilen ractopamin tespiti için yeni bir elektrokimyasal biyosensöre uygulamak üzere Zhang ve arkadaşları tarafından sentezlenmiştir (Zhang *et al.*, 2015). Ractopamin tespiti için sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS) (Shishani *et al.*, 2003; Blanca *et al.*, 2005), gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) (He *et al.*, 2007), yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve biyoanaliz (Liu *et al.*, 2012) yöntemleri gibi birçok analitik yöntemler geliştirilmiştir. Yüksek enstrüman maliyeti ve uzun süreli analizler nedeniyle bu yöntemlerin bazı sınırlamaları vardır. Sorunu çözmek için, ractopamin'i elektrokimyasal olarak aktif yapan fenolik hidroksil grubu kullanılarak elektrokimyasal yöntemler uygulanmıştır (Wu *et al.*, 2012). Bununla birlikte, bu tespit yöntemi, elektrot yüzeylerindeki düşük tepki aktivitesinden dolayı da sınırlandırılmıştır. Yeni bir elektrokimyasal biyosensör olarak hibrit nanoçiçek bu dezavantajın üstesinden gelmektedir. Bu nanoçiçekler manganez (II) iyonları ve üç tip protein, bir immünoglobülin G(IgG), ractopamine antikoru (RACanti) ve sığır serum albümini (BSA) kullanılarak yapılmıştır. Geliştirilen elektrokimyasal biyosensörlerin tespit sınırları sırasıyla 4.6, 9.32 ve 26 pg mL⁻¹ olarak analiz edilmiştir. Önceki farklı yöntemlerin tespit sınırlamalarıyla karşılaştırıldığında, bu sonuçlar hibrit nanoçiçek kullanan elektrokimyasal yöntemlerin daha duyarlı olduğu sonucuna varmışlardır (Wu *et al.*, 2012; Duan *et al.*, 2013, Jin *et al.*, 2014). Bu çalışma ile hibrit nanoçiçeklerin elektrokimyasal araçlar olarak hem katalizör hem de ilaç dağıtımında kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

Bakır (II) iyonu ve DNA kullanılarak sentezlenen nanoçiçekler

Hu ve arkadaşları hibrit nanoçiçeklerde organik materyal olarak protein yerine DNA'yı kullanmışlardır (Hu *et al.*, 2014). DNA, sulu ortamda yüksek oranda çözünür olduğu ve protein gibi yapısında yüksek miktarda azot atomu bulunduğundan, metal iyonlarının bağlanmasıyla hibrit nanoçiçeklerin sentezinde kullanılabilir. DNA hibrit nanoçiçek morfolojisi hücrelerin yüksek çözünürlüklü görüntülerini elde etmek veya izlenebilir ilaç dağıtım sistemleri için kullanmak üzere floresans rezonans enerji transferi (FRET) ile incelendi. Kısaca, araştırmacılar bir ilaç ve floresans boyaların (FAM, CY3, ROX) eş zamanlı

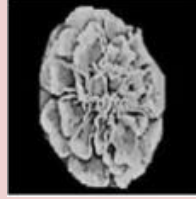
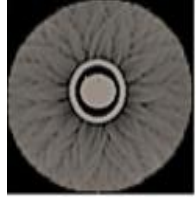
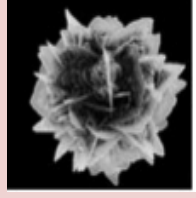
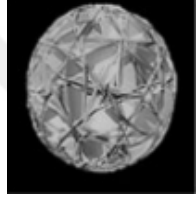
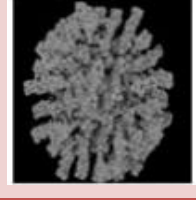
bağlanması için DNA şablonunda bir yer oluşturarak metal iyonları ile yuvarlanan daire replikasyonu (RCR) ile üretilen DNA'ya bağlanmış bir hibrit nanoçiçeği sentezlemişlerdir. Sonuç olarak, uzun dalga boylu ışık kullanan boyalar arasındaki FRET'e dayanarak hücreleri etkilemeyen yüksek çözünürlüklü bir görüntü elde etmişlerdir. Ayrıca, canlı hücrelerde ilaç dağıtım yolu boyaların yaydığı ışığın belirlenmesiyle başarılı bir şekilde izlenmiştir. Böylece, Hu ve ark. DNA hibrit nanoçiçeklerini önerdi ve böylece DNA hibrit nanoçiçekleri sentezinin fizibilitesi/uygulanabilirlik göstererek, artık bu yöntem birçok alanda kullanılabileceğini anlaşılmıştır (Hu *et al.*, 2014).

Bakır (II) iyonları ve proteinler kullanarak hazırlanan kapsüler nanoçiçekler

Jiang ve çalışma arkadaşları araştırmalarında kapsül nanoçiçeği sentezlemişlerdir (Li *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2014). Bir metal fosfat ve proteinden sentezlenen ilk hibrit nanoçiçeklerle karşılaştırıldığında, kapsüler nanoçiçekler bir biyomimetik mineralizasyon yaklaşımı ile protamin ve silika ile ilave bir sarım ve metalin çekirdekten çıkarılmasıyla sentezlemişlerdir. Çoklu kabukların pürüzlü yüzeyi, substratların adsorpsiyonunu kolaylaştırdığından, kapsüler nanoçiçeği, zor koşullar altında (yüksek sıcaklık, pH, uzun süreli depolama) basit hibrit nanoçiçeklerden daha yüksek stabilite ve önemli ölçüde arttırılmış enzim aktivitesi sergilediğini gözlemlemişlerdir. Bu özellikler, kataliz ve ilaç dağıtımı gibi biyo-kimyasal uygulamalarda etkinliği artırmak için uygulanabilir ve kullanışlı bir çözüm sağlar.

Nanoçiçekler metal iyonlarıyla, yapı ve boyutlarına göre sınıflandırılırlar. Nanoçiçeklerin sentezinde bakır, kalsiyum, mangan, protein ve DNA gibi farklı atomlar kullanılarak yapılan uygulamaları Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. Nanoçiçeklerin Farklı Metal İyonu ve Substratlarla Uygulama Alanları

Nanoçiçek çeşitleri	Substrat	Metal iyonu	Uygulama alanı	Yapı
Bakır nanoçiçekleri	Protein	Bakır	Etkili ilaç dağıtımı, hücre görüntüleme, biyosensör ve farklı tıbbi yaklaşımlar	
Kalsiyum nanoçiçekleri	Protein	Kalsiyum	Proteinlerin çevredeki işlevselliği	
Mangan nanoçiçekleri	Protein	Mangan	Biyosensör olarak	
Bakır nanoçiçekleri	DNA	Bakır	Yüksek çözünürlüklü hücre görüntüleme, hedefe gönderilen ilaç takibi	
Bakır-kapsül nanoçiçekleri	Protein	Bakır	Yüksek enzim aktivitesi ve stabilitesi, katalizör	

Yapısal özellikleri ve enzim verimliliği

Hibrit nanoçiçekler serbest enzime kıyasla şekil, boyut, protein/toplam ağırlık oranı ve enzim verimliliği gibi temel özelliklere göre sınıflandırılabilirler. Hibrit nanoçiçeklerin boyutu protein konsantrasyonuna göre değişim gösterebilir (yaklaşık $\pm 3 \mu\text{m}$). Bundan dolayı optimizasyon verilerine göre nanoçiçeklerin boyutu 2 ile 30 μm aralığında ve yapraklar arasındaki gözenek boyutu 0,1 μm 'dir. Bu sentezlenen çiçek şeklindeki hibrit yapılar mikrometre ölçekte olmalarına rağmen, bunlar nanoboyuttaki yapraklardan meydana gelmelerinden dolayı “nanoçiçek” olarak adlandırılmaları yine ilk defa Lee *et al.* (2015) tarafından yapılmıştır. Hibrit nanoçiçeklerin şekli çok küçük farklılıklarla yuvarlak çiçeklere benzerdir.

Proteinin toplam partikül ağırlığına termogravimetrik analiz (TGA) ile ölçülen ağırlık oranı da proteinin toplam ağırlığın %10-66'sını oluşturduğunu göstermektedir. Ayrıca, daha fazla protein kullanıldığı için protein yüzdesi artar. Bununla birlikte, kapsülleme verimliliği tamamen zıt bir eğilim izler. Sabit bir inorganik bileşenin ağırlığına aşırı miktarda protein eklenmesi, kapsülleme verimliliğinde çarpıcı bir düşüşe neden olur. Bu sebepten dolayı, uygun miktarda protein seçimi proteini korumak ve iyi bir morfoloji ve yüksek bir ağırlık yüzdesi elde etmek için önemlidir.

Hibrit nanoçiçek yapılarının enzim aktivitesindeki verimi serbest enzimle kıyaslandığında %85 ile %1000 oranında değişim göstermektedir. Bu sonuçlar, hibrit nanoçiçek yapılarının serbest enzimlere göre daha yüksek aktivite ve stabiliteye sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, hibrit nanoçiçekler daha önce karşılaşılan kütle transfer sınırlama probleminin üstesinden gelir ve çeşitli araştırma ve tespit alanlarına uygulama için bir yol açar.

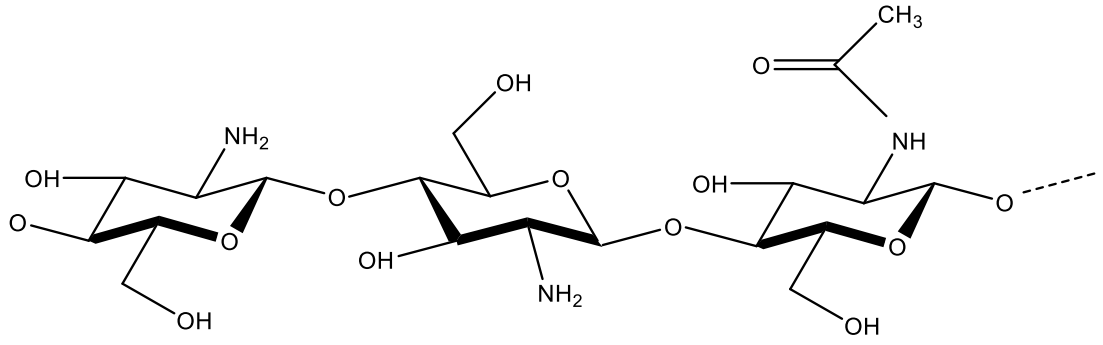
Hibrit nanoçiçeklerin oluşum mekanizması

Organik-inorganik hibrit nanoçiçeklerin oluşum mekanizması üç adımda gerçekleşir. İlk büyüme adımında, birincil metal fosfat kristalleri [$M_3(PO_4)_2$, (M: Cu, Ca)] oluşur. Bu adımda organik moleküller (protein, DNA), esasen protein omurgasındaki amid gruplarının aracılığıyla koordinasyon sağlayarak metal iyonları (Cu^{2+} , Ca^{2+}) ile kompleksler oluşturur. Bu kompleks yapılar ilk kristal yapıların çekirdeklenmesi için bir konum sağlar. İkinci büyüme aşamasında, metal-protein kristalleri büyük protein moleküllerinin kümeleşmesiyle primer yaprakları oluşur. Metal fosfat kristallerinin kinetik olarak kontrol edilen büyümesi, bu aglomeratların Cu^{2+} bağlanma bölgelerine sahip yüzeylerden kaynaklanır ve başlangıçta görünen yapraklar çiçek-şekilli oluşumuna sebep olur.

Son basamakta ise, anizotropik büyüme ile hibrit nanoçiçeklerin oluşumu tamamlanır. Protein ve metal iyonu hibrit nanopartikülün şeklini tamamlaması için kilit bileşendir. Protein çekirdek partikülü ve nano yaprak oluşumunda model gibi davranır ve büyüme aşamasında nanoyaprakları bir arada tutar yaprakları birbirine bağlamak için bir "tutkal" görevi görür. Ortamda protein olmadığı zaman büyük kristal parçaları meydana gelir fakat nanoçiçek yapıları meydana gelmez.

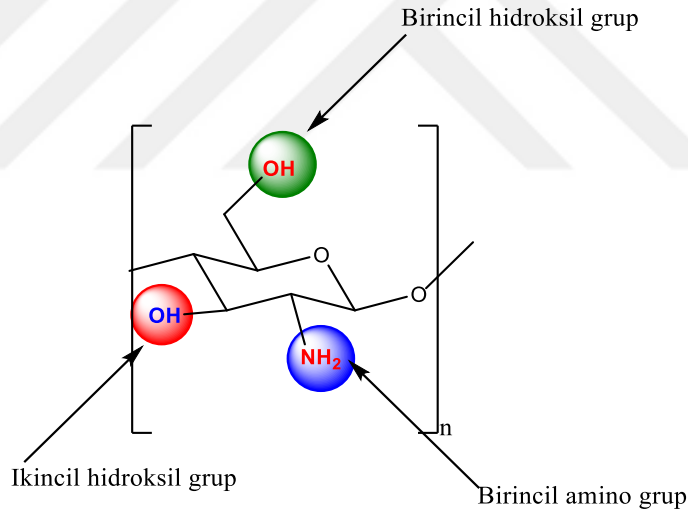
Kitosan

Kitosan, 2-amino-2-deoksi- D - glukopiranoz birimlerinin ve artık 2-asetamido-2-deoksi- D - glukopiranoz birimlerinin tekrarlanan birimlerinden oluşan bir kopolimerdir (Şekil 9).



Şekil 9. Kitosanın genel yapısı

Kitosan, kitinin alkalın hidrolizinden (deasetilasyon) elde edilir ve ayrıca bazı mantar hücre duvarlarında doğal olarak bulunur. Kitosan, monomerinde birincil amin (NH_2), birincil ve ikincil hidroksil grubu (OH) gibi uygun fonksiyonel gruplara sahiptir (Şekil 10). Bu nedenle polimerizasyon derecesini bozmadan kimyasal olarak modifiye edilebilir (Mourya *et al.*, 2008). Kitosanın kimyasal modifikasyonu, polimerin metal iyonları, organik bileşikler, örneğin ilaçlar gibi diğer bileşenlerle etkileşimini kontrol etmek için güçlü bir tekniktir (Croisier *et al.*, 2013).



Şekil 10. Kitosan birimindeki fonksiyonel gruplar

Kitosan farklı kimyasal ve biyolojik özelliklere sahiptir. Yüksek moleküler ağırlıklı lineer poliglikozamin zincirlerinde kitosan, kimyasal modifikasyonlara uygun reaktif amino ve hidroksil gruplarına sahiptir (Peter, 1995; Krajewska, 1991). Ek olarak amino grupları, kitosanı doğada bulunan az sayıdaki katyonik bir polielektrolit ($\text{pK}_a \approx 6.5$) yapar. Bu temel kitosana özgü özelliklerini verir: kitosan, $\text{pH} < 6.5$ olan sulu asidik ortamda çözünür ve çözündürüldüğünde $-\text{NH}^+$ gruplarında yüksek pozitif yüke sahip olduğunda, negatif yüklü yüzeylere yapışır, polianyonik bileşiklerle toplanır ve ağır metal iyonlarını şelatlar. Hem asidik çözeltilerdeki çözünürlük hem de polianyonlarla agregasyon, mükemmel jel oluşturma özelliklerine sahip kitosan verir. Biyouyumluluk, zararsız ürünlere biyolojik olarak

parçalanabilirlik, toksik olmama, fizyolojik inertlik, proteinlere karşı kayda değer afinite, hemostatik, fungistatik, antitümöral ve antikolesteremik özellikler, henüz kullanılmamış olan kitosan hızla büyüyeceği öngörülen geniş bir uygulama yelpazesinde olağanüstü bir potansiyel sunmaktadır. Biyo ve biyolojik olarak bozunabilir polimerler kitosan materyalleri çevre dostu olduğundan, insanlar ve doğal çevre için güvenlidir (Dutta *et al.*, 2002).

Kitosan benzersiz biyolojik özelliklere sahip olmasından dolayı tıp ve biyoteknoloji alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Tıpta bakteriyostatik ve fungistatik ajanlar, ilaç taşıyıcı araçlar, ilaç kontrollü salım sistemleri, yapay hücreler, yara iyileştirici merhemler/sargılar, hemodiyaliz membranları, kontakt lensler, suni deri, cerrahi dikişler ve doku mühendisliği için kullanılabilirler. Diğer yandan biyoteknolojide kromatografik matriksler, membran ayırma için membranlar ve özellikle enzim/hücre immobilizasyon destekleri olarak uygulama bulabilirler (Paul *et al.*, 2000).

Mikroorganizmalar

Pektin liyaz enziminin üretiminde bakteri, mantar ve mayalar kullanılmıştır. Mikrobiyal pektin liyaz enzimi üretiminde *Bacillus*, *Erwinia*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, ve *Aspergillus* sıklıkla kullanılan mikroorganizmalardır. *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* pektin liyaz aktivitesinin çoğunluğu mantar cinsi tarafından üretilir. Ancak bakteri ve mayalardan üretilen pektin liyaz enzimi çalışmaları mevcuttur.

Lactobacillus plantarum

Lactobacillus plantarum, bitki bazlı fermente gıdaların yanı sıra et, balık ve fermente süt ürünlerinde bulunan çok yönlü bir fakültatif hetero-fermantif laktik asit bakterisidir (Marco *et al.*, 2017). İlk olarak tükürükten izole edilmiştir. Basil şeklinde gram pozitif bir bakteridir. *L. plantarum* hücreleri genellikle 3–8 µm uzunluğunda ve 0,9–1,2 µm genişliğinde düz ve yuvarlak uçlu kısa zincir şeklinde çubuklardır. Büyüme sıcaklığı 15–40 °C arasındadır.

L. plantarum, ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından genellikle güvenli (GRAS) olarak kabul edilen ve fermente süt, et, tahıllar yoğurt, peynir, sosis, soya sosu, tahıl içecekleri, kimchi, vb. gibi gıdalarda yaygın olarak kullanılan önemli bir laktik asit bakterileri sınıfıdır.

Birçok çalışma *L. plantarum*'un patojen bakteriyel enfeksiyonu önlemeye, inflamasyonu düzenlemeye, lipid metabolizmasını iyileştirmeye ve yaşlanmayı geciktirmeye yardımcı olabileceğini göstermiştir (Lee *et al.*, 2018; Tang *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018). Adezyon ve kolonizasyon probiyotiklerin taranması için ana kriterlerdir ve konakçı bağırsak

sisteminde probiyotiklerin uzun süreli tutulmasını ve fizyolojik işleyişini teşvik etmenin öncüsü ve temelidir (Collins *et al.*, 1998).

Aeribacillus pallidus

Aeribacillus pallidus hidrokarbon kullanımı ve biyoemülgatör üretim kabiliyeti ile petrol rezervuarından (Peng *et al.*, 2019), kaplıcadan (Yasawong *et al.*, 2011) ve yüksek sıcaklık petrol sahalarından saflaştırılan (Zhou *et al.*, 2018) daha önce *Geobacillus pallidus* (Minana-Galbis *et al.*, 2010) olarak sınıflandırılan termofilik ve aerobik bir bakteridir. Termofilik bakteriler yüksek sıcaklığa, pH ve yüksek basınca dayanıklı olduklarından dolayı endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılırlar.

A. pallidus 0,8-2,5 µm genişliğinde, 2-5 µm uzunluğunda yassı ve krem renkli kolonileri olan çubuk şeklinde bakterilerdir. 30-70°C sıcaklık aralığında büyüyen optimum büyüme sıcaklığı ise yaklaşık olarak 60°C'dir.

A. pallidus YM-1'in kimyasal yüzey aktif cisimlere göre düşük toksisite, biyobozunurluk ve biyoyumumluluk avantajları sergileyen bir biyoemülgatör ürettiği bulunmuştur (Zheng *et al.*, 2012).

Pseudomonas fragi

Pseudomonas fragi psikrotrofik gram negatif bir bakteridir. *P. fragi*, lipazlar ve proteazlar dahil olmak üzere çeşitli tipte enzimler üretebilir (Wang *et al.* 2017). Bu enzimler et, balık, sebze ve süt ürünlerinin bozulmasından sorumludur. *P. fragi* lipaz ve esteraz, kısa zincirli yağ asitlerini süt yağından hidrolize eder ve asitleri etanol ile reaksiyona sokarak etil esterlere dönüştürür. Bu bakteri için büyüme sıcaklığı 0-35°C arasındadır. En uygun büyüme sıcaklığı ise 30°C'dir (Ercolini *et al.* 2010).

KAYNAK ÖZETLERİ

Fonksiyonel materyaller olarak, kitin ve kitosan biyouyumluluk, zararsız ürünlere biyolojik olarak parçalanabilirlik, toksik olmama, fizyolojik inertlik, antibakteriyel özellikler, ağır metal iyonları şelasyonu, jel oluşturma özellikleri, hidrofiliklik ve proteinlere dikkat çekici afinite gibi benzersiz özellikler sunar. Bu özelliklerden dolayı, henüz yetersiz kullanılan kitin ve kitosan bazlı malzemelerin, özellikle enzim immobilizasyon destekleri olarak, biyolojik ortamlarda çalışan sistemlerde, çevresel olarak güvenli uygulamalarda, yakın gelecekte yaygın olarak kullanılması öngörülmektedir (Krajewska, 2003).

Biyolojik makromoleküller, öncelikle endüstriyel enzimlerin üretiminde mikrobiyal temelli büyümeyi esas alarak büyümeyi güçlendiren karmaşık polisakkarit yapılardan oluşur. Meyve suyu endüstrisinde en büyük zorluklardan biri parçalanmış hücre duvarları ve hücre materyalleri yapısındaki polisakkaritlerin varlığıdır. Pektin ve selüloz gibi büyük molekül yapılarının parçalanması meyve suyu endüstrisinde büyük önem taşımaktadır. Poligalakturonaz (PG), pektin liyaz (PL) ve pektin metilesteraz (PME) dahil olmak üzere pektinolitik enzimler, *Aspergillus ornatu*s'tan izole edilerek istatistiksel olarak optimize edilmiş ve amonyum sülfat fraksiyonu (ASF), diyaliz ve Sephadex G100 jel permeasyon kromatografisiyle saflaştırılmıştır. Sephadex G-100 kolonundan geçtikten sonra, PG, PL ve PME sırasıyla 2,60 kat, 3,30 kat ve 4,52 kat ve 475,2 U/mg, 557,1 U/mg ve 205,7 U/mg spesifik aktiviteleri ile saflaştırılmıştır. Aktif PG, PL ve PME'nin her biri ayrı ayrı, makromoleküler bir çapraz bağlama maddesi olarak çeşitli konsantrasyonlarda kitosan ve dekstran polialdehit kullanılarak immobilize edilmiştir. Meyve suyu berraklaştırma amacıyla kullanmadan önce saflaştırılmış ve kitosan ile immobilize edilmiş fraksiyonların pH, sıcaklık ve Michaelis-Menten kinetik sabitleri dahil çeşitli parametreler araştırılmıştır. Immobilizasyondan sonra pH ve sıcaklık parametrelerinde önemli bir gelişme kaydetmişlerdir. Bununla birlikte, saflaştırılmış serbest ve kitosan ile immobilize fraksiyonların K_m ve V_{max} değerleri arasındaki ihmal edilebilir fark, pektinolitiklerin konformasyonel esnekliğinin bu şekilde korunduğunu ortaya koymuşlardır. CTS-PG ile 60 dakikalık muameleden sonra CTS-PME ve CTS-PL ile önemli bir renk ve bulanıklık azalması kaydetmişlerdir. CTS-PME, CTS-PG ve CTS-PL ile elma, şeftali, mango ve kayısı meyve sularının arıtılmasında gıda endüstrisinde meyve suyu sanayinde önemli ölçüde etkilendiği sonucuna varmışlardır (Irshad *et al.*, 2017).

Fizyolojik ortamdan farklı olarak verilen ortamlarda yüksek aktiviteyle yeniden yapılandırılan enzimler, endüstriyel biyokatalitik süreçlerde, ilaç endüstrisinde, biyosensör vb. gibi uygulamalar için sıklıkla araştırılmıştır. Enzim katalizörlerinin immobilizasyon kimyasal yaklaşımlarla yeniden yapılandırılması etkili ve basit bir yoldur. İmmobilize enzimler ve kimyasal modifiye enzimler serbest enzimlerden daha yüksek aktivite göstererek çoklu ve tekli enzim sistemleri olarak kullanılabilirler (Zhang *et al.*, 2015).

Enzimlerde immobilizasyon, endüstriyel uygulamalarda enzimlerin işlevselliğinin optimizasyonudur. İmmobilize edilmiş enzimlerin performansını arttırmak için literatürde şimdiye kadar farklı matrisler tanımlanmıştır. Nanoteknolojinin gelişile, nanomateriyaller benzersiz fiziko-kimyasal özellikleri nedeniyle enzim immobilizasyonu için yeni ve ilginç matrisler oluşturulmuştur. Nanomalzemelerin boyut özelliklerinden dolayı etkili yüzey alanı, etkili enzim yüklemesi ve kütle transfer direnci enzimlerin verimliliğini belirleyen ideal özelliklere sahiptir. Nanomalzemeler, spesifik yüzey alanı, kütle transfer direnci ve etkili enzim yüklemesi dahil olmak üzere biyokatalizör verimliliğini belirleyen temel faktörleri dengelemek için ideal özelliklere sahiptir. Ahmad ve Sardar'ın 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada immobilizasyon matrisi olarak nanoyapıların avantajları ve dezavantajları da tartışılmaktadır (Ahmad and Sardar, 2015).

Dünyadaki biyoteknolojik endüstrilerin mevcut talepleri enzim verimliliğinde artış ve raf ömrünü uzatmak için yeni tekniklerin geliştirilmesidir. Enzim immobilizasyonu, önemli bir süre boyunca substrat ile enzimin uygunluğunu artırarak mükemmel bir temel sağlar. Enzim immobilizasyonunun verimini artırmak için doğal ve sentetik destek yapıları incelenmiştir. Günümüzde, immobilize enzimler, istenilen ürünün hücre kütlelerinden ayrılarak saflaştırılması ve saflaştırma işlemlerini azaltan uzun süreli mevcudiyetleri nedeniyle serbest muadillerine göre tercih edilmektedir. Gelecekteki araştırmalar, enzim immobilizasyonunun durumunu iyileştirmek ve sanayi sektörüne yeni bakış açıları sağlamak için yenilikçi ve modifiye edilmiş destek tekniklerinin yanı sıra lojistik ve mantıklı immobilizasyon tekniklerini benimsemeye çalışmalıdır (Datta *et al.*, 2013).

Pratik uygulamalarda son derece katalitik aktivite ve seçicilik sergileyen enzimler katalizörler olarak eşsiz bir potansiyel göstermektedir. Enzimler sıcaklık ve kimyasallarla muamele edildiğinde kararsız yapıya sahiptirler. Bu kararsız yapıların önüne enzimlerin immobilize edilmesi ile geçilebilmektedir. Bu işlemin, farklı enzim-taşıyıcı etkileşimlerini kullanan çeşitli test edilmiş yöntemleri arasında, katı taşıyıcılar üzerine adsorpsiyon yoluyla yapılan immobilizasyonun en yaygın olduğu görülmüştür. Enzimlerin etkili adsorpsiyonu

için geliştirilen taşıyıcılar, taşıyıcı modifiye ediciler ve prosedürleri tartışmışlardır (Jesionowski *et al.*, 2014).

Phadtare *et al.* 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada altın nanopartikül membran yapılarının oluşmasını ve pepsin enziminin immobilizasyonunda kullanımını göstermişlerdir. Nanoaltın membran yapıları sıvı-sıvı arayüzündeki sulu kloroaurat iyonlarının kloroform içinde alınan iki fonksiyonlu molekül bis (2-(4-aminofenoksi) etil) eter tarafından indirgenmesi ile sentezlemişlerdir. Bu işlem, polimerik bir zemine gömülü altın nanoparçacıklardan oluşan sağlam, şekilenebilir, serbest duran bir nanoaltın zarının oluşması ile sonuçlanmıştır. Altın nanopartiküller enzimlerin immobilizasyonu için mükemmel adaylar olduğundan yeni bir biyokatalizör sınıfına yol açarak nanoaltın membran üzerine pepsin immobilize edildiğini yapılan araştırmalarla göstermişlerdir. Yeni pepsin-nanoaltın biyokatalizörün vurgulanmasının nedeni, reaksiyon ortamından ayrılmasının kolaylığıdır. Biyokonjugattaki pepsin katalitik aktivitesi, çözelti içindeki serbest enzim aktivitesi ile karşılaştırılabilir. Araştırmacılar, pepsin immobilize edilmiş nanoaltın membran biyokonjugat malzemesi 10 kez tekrar tekrar kullanım döngüsü boyunca mükemmel biyokatalitik aktivite ve ayrıca sıcaklık, pH ve zamana karşı stabilite sergilediğini ifade etmişlerdir.

Diğer bir araştırmada, *Bacillus subtilis* 1 α -amilazı farklı immobilizasyon metotları ile değişik destek materyallerine immobilize edilmiştir. Aminoalkilsilan-alumina (AS-alumina) üzerine fiziksel adsorbsiyon, DEAE selüloz üzerine iyonik bağlama, kitin üzerine kovalent bağlama ve poliakrilamid üzerine hapsedilerek en yüksek aktiviteyi sağlayan immobilize enzimler hazırlamışlardır. Sabit protein bazında hesaplanan immobilize enzimlerin spesifik aktivitesi, serbest enzim tarafından sergilenen orijinal spesifik aktivitenin %13.5-50'si olarak hesaplamışlardır. Serbest amilaz için optimum reaksiyon sıcaklığının 45°C olduğu, immobilize enzimler için ise 60-65°C'ye yükseldiği belirlemişlerdir. Immobilize α -amilaz enziminin nişasta hidrolizi için K_m değerini serbest α -amilaz enziminden daha yüksek hesaplamışlardır. Serbest forma kıyasla, immobilize enzimler gelişmiş sıcaklığa karşı daha kararlı ve denatürasyonun daha yüksek aktivasyon enerjisi değerlerini sergilediğini göstermişlerdir (Abdel-Naby *et al.*, 1998).

Penicillium italicum'dan pektin liyaz [PNL, poli (metoksigalakturonid) liyaz, E.C. 4.2.2.10] enzimi çözünür ve immobilize edilmiş enzimin fiziko-kimyasal ve kinetik özelliklerini karşılaştırmak için Naylon 6'ya kovalent bağlanma ile immobilize edilmiştir. Immobilizasyon işlemi için optimum koşullar, kinetik parametreler, enzimin pH ve sıcaklık davranışı incelenmiştir.

Serbest ve immobilize enzimin pH aktivite eğrisi karşılaştırıldığında immobilize enzim düşük pH değerlerinde daha aktif olduğu görülmüştür. Ayrıca, immobilize pektin liyaz enzimi serbest enzime kıyasla düşük pH değerlerinde kararlı bir yapıda olduğunu izlemişlerdir. İmmobilizasyon işlemi enzimin, serbest enzime kıyasla termal kararlılığında artış meydana getirmiştir. İmmobilize pektin liyaz depolama sürecinde +4°C’de stabil kaldığını ifade etmişlerdir. İmmobilize enzim 12 kez tekrar tekrar kullanıldığında katalitik aktivite kaybı gözlemlenmemişlerdir. Serbest ve immobilize pektin liyaz enzimi karşılaştırıldığında immobilize enzim pektin çözeltilerinde daha az viskozdur. Bununla birlikte, meyve suyu durultma işleminde serbest enzim pektin çözeltilerini durultmak için kullanıldığında ilk viskozitedeki düşüş gözlemlenerek işaretlenmiştir. Naylon-immobilize PNL, meyve sularının 40°C’de ve yaklaşık pH 3.0 değerinde durultulması için umut verici görünmektedir (Alkorta *et al.*, 1996)

Pektinaz (E.C. 3.2.1.15) enzimi epoksi-aktifleştirilmiş akrilat kopolimer DİLBEAD-VWR ile polietileniminin (mol. wt. 70,000) reaksiyonuyla hazırlanan geri dönüşümlü polimer destek materyaline başarıyla immobilize edilmiştir. Pektinaz enzimi iki aşamada immobilize edilmiştir. İlk olarak iyon değişim yöntemi ile pH 7’de polimer üzerine adsorbsiyon işlemi uygulanmış daha sonra ise dekstran aldehit ile çapraz bağlanarak stabil hale getirilmiştir. Serbest enzimin optimum pH değeri 5.0 iken immobilize enzimin pH 3.0-7.0 geniş bir pH aralığında yüksek düzeyde aktivite sergilemiştir. Serbest ve immobilize enzimlerin termal stabilitesi aynı olmasına rağmen, immobilize enzim oda sıcaklığında, elma suyunun durultulması işleminde aktivitesinin %5’inden daha az kaybıyla 10 kezden fazla tekrar kullanılabileceğini göstermişlerdir. İmmobilize enzimde aktivite kaybı gözlemlendiğinde immobilize enzim ve dekstran aldehit 1 N HCl ile birlikte belirli işlemlerden sonra destek materyalinden ayrılarak destek materyalinin tekrar kullanılabilirliğini bildirmişlerdir. Destek materyalinin enzimden ayrılarak tekrar kullanılabilirliği ekonomik açıdan çekici hale gelmiştir. Elma suyu serbest ve immobilize enzim ile deneysel çalışmalar sonucunda benzer sonuçlar gösterdiğini ifade etmişlerdir (Rajdeo *et al.*, 2016).

Pektinaz enzimi makromoleküler çapraz bağlama ajanı olarak dekstran polialdehit ile kitosan manyetik nanopartiküller (CMNPs) üzerine immobilize edilmiştir. Çapraz bağlama konsantrasyonu, zaman ve kitosan manyetik nanopartikül-enzim oranı gibi parametrelerin optimizasyonu yapılmıştır. Pektinaz manyetik nanopartiküllerin karakterizasyonu, XRD ve FT-IR ile yapılmıştır. İmmobilize enzim ile termal çalışmalar sonucunda 55-75 °C sıcaklık aralığında serbest enzime kıyasla daha stabil kaldığını ifade etmişlerdir. İmmobilize pektinazın V_{max} ve K_m değerleri, konformasyonel esnekliğin göstergesi olan doğal forma

neredeyse eşit bulunmuştur. İmmobilize pektinazın kalan aktivitesi, birbirini izleyen yedi tekrar kullanımdan sonra %85 iken, mükemmel stabilite ve dayanıklılık sergileyen 15 günlük depolamada %89'a kadar kalan aktivitesini korumuştur. İmmobilizasyon işleminden sonra pektinaz enziminin konformasyonel değişimleri FT-IR spektrofotometrisi ile incelemiştir. Son olarak, 150 dakika muameleden sonra %74'e kadar bulanıklık azalması gösteren elma suyu arıtımı için manyetik pektinaz nanobiyokatalizör kullanılmıştır (Sojitra *et al.*, 2017).

P. aculeatum NRRL-896'dan (α -1, 6-glukan 6-glukan-hidrolaz, EC 3.2.1.11) saflaştırılan dekstranaz farklı taşıyıcılar üzerine fiziksel adsorpsiyon, tutuklama, kovalent bağlanma ve çapraz bağlama gibi farklı yöntemler kullanılarak immobilize edilmiştir. Doğal polimer polisakkaritler (örneğin; CMC, kitosan, aljinat, Oyster mantar sapı ve aktif kömür), sentetik polimerler (örneğin; poliakrilamid jel ve hidroksiapatit) ve inorganik taşıyıcılar (örneğin; bentonit ve silika jel) gibi organik taşıyıcılar dekstranaz immobilizasyon tekniği için matriksler olarak kullanılmıştır. *P. aculeatum* dekstranazın fiziksel adsorpsiyonla bentonite immobilizasyonu 263.74 ünite/g taşıyıcı en yüksek aktiviteye sahip, immobilizasyon verimi %74,88, spesifik aktivite 19989,44 birim/100 mg protein, üretilen izomaltoz miktarının 1,12 mg/ml olduğunu ve orijinal aktivitesinin yaklaşık %67'sini koruduğunu göstermiştir. (Gibriel *et al.*, 2014)

Pektin liyaz (Rohaspect 10 L'den), pH 5, 6,5 veya 8'de düşük iyonik kuvvette glutaraldehit ara kol bağlantısı ile destek materyalinin üzerine immobilize edilmiş ve daha sonra pH 8'de 48 saat süreyle inkübasyona tabi tutulmuştur. Biyokatalizörlerin pektine karşı aktivite geri kazanımı 20 °C'de immobilize edilmiş tüm biyokatalizörler için %10'un altında oldukça düşük olduğunu hesaplamışlardır. Bununla birlikte, enzim pH 5'te immobilize edildiğinde yüksek stabilizasyon bulunmuş (örneğin, immobilize enzimin, serbest enzim tamamen etkisiz hale geldiğinde aktivitenin %83'ünü koruduğunu hesaplamışlardır (5 saatte pH 4,8 ve 55 °C)). Bu biyokatalizör, çalışmada kullanılan maksimum sıcaklığa (90 °C) ve serbest enzimin neredeyse etkisiz olduğu durumlara ulaşana kadar, pektine karşı aktivitesini katlayarak arttırmıştır. İmmobilize biyokatalizör, serbest enzimin tamamen inaktif olduğu pH 9'da bile aktivite göstermiştir. Bu biyokatalizör, başlangıç aktivitesinin %90'ından fazlasını koruyarak 40 °C'de 72 saat reaksiyon döngüleri için 5 kez pektin hidrolizi için tekrar kullanılabileceğini göstermişlerdir (Magro *et al.*, 2020).

Mükemmel katalitik özelliklerine rağmen, enzim özelliklerinin endüstriyel ölçekte uygulanmalarından önce (yüksek verimli işlemlerin birçok döngüsünün arzu edildiği) genellikle iyileştirilmesi gerekir. Genel olarak, çözünebilir enzimlerin endüstriyel reaktörlerde uzun süre tekrar kullanılmak üzere immobilize edilmesi gerekir ve buna ek olarak, stabilite,

aktivite, reaksiyon ürünleri ile inhibisyon, doğal olmayan substratlara karşı seçicilik gibi bazı diğer kritik enzim özelliklerinin iyileştirilmesi gerekir. Basit immobilizasyon yöntemleri ile immobilize enzimlerin serbest formdaki enzimlerden işlevsel özellikleri daha iyidir. Ayrıca, farklı enzimlerin (örneğin lipazlar) enantio seçiciliği, aynı enzimin farklı immobilizasyon protokolleri gerçekleştirilerek önemli ölçüde geliştirilebilir ($E = I'den > 100'e$). Immobilizasyon yöntemleri enzim mühendisliği enzimlerin işlevsel özelliklerini daha iyi bir hale getirmek için kimyasal ve biyolojik yaklaşımlarla uyumludur (Mateo *et al.*, 2007).

Biyokatalizörlerin ticari uygulaması, etkili immobilizasyon yöntemlerinin geliştirilmesine bağlıdır. Enzim immobilizasyonu enzimlerin stabilitesini büyük ölçüde artırarak enzim maliyetini azaltır ve bu nedenle verimli, seçici ve çevre dostu kataliz için tüm endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır. Tran and Balkus çalıştıkları bu yayında, gözenekli yapıdaki malzemelere enzim immobilizasyonundaki gelişmeleri anlatmaktadır. İnorganik mezogözenekli materyallerde enzimlerin immobilizasyonu ve bu materyallerde yapılan modifikasyonlar ile ilgili son çalışmalar özetlenmiştir. Enzimlerin immobilizasyonunda lifli membranların kullanılması verimli kataliz işlemleri için yüzey alanları sunar. Bu membran biyoreaktörleri enzim immobilizasyonunun bir sonucu olarak çalışma koşullarında enzim stabilitesini korurken, sürekli bir akış süreci içinde biyotransformasyonların gerçekleştirilmesine de izin verir (Tran and Balkus, 2011).

Yakın geçmişte endüstriyel enzimlerin maliyetini düşürmek, aktivite ve stabiliteyi artırmayı amaçlayarak geleneksel immobilizasyon yöntemlerini geliştirmek için yeni taşıyıcılar denenmiştir. Bunlar çapraz bağlı enzim, mikrodalga kullanılarak immobilizasyon ve nanopartiküllere enzimlerin immobilize edilmesidir. Nanopartiküllerin elektriksel, optik, fiziksel ve kimyasal özellikleri biyomoleküllerin özellikleri ile birleşmesiyle son teknolojik uygulamalarda kullanılmaya başlanmıştır. Nanopartiküller tarafından sunulan yüksek yüzey-hacim oranı, immobilizasyon konsantrasyonunun, düzlemsel 2-D yüzeyler üzerinde immobilizasyonuna dayalı deneysel protokoller tarafından sağlanandan önemli ölçüde daha yüksek olmasına neden olmuştur. Nanopartiküllere immobilizasyon işlemlerinde kararlı geniş bir pH aralığı ve sıcaklık aralığı göstermiştir. Geleneksel immobilizasyon yöntemleri ile karşılaştırıldığında nanopartikül bazlı immobilizasyon 3 önemli özelliğe sahiptir; (i) nano enzim partiküllerinin, yüzey aktif maddeler ve toksik reaktifler kullanılmadan yüksek katı içerikte sentezlenmesi kolay, (ii) kalın enzim kabuğuna sahip homojen ve iyi tanımlanmış çekirdek-kabuk nanopartiküller elde edilebilir ve (iii) partikül boyutu, kullanım sınırları dahilinde uygun şekilde uyarlanabilir. Ayrıca nanopartiküller üzerine immobilizasyonda

birden fazla enzim immobilize etmenin mümkün olduğunu ifade etmişlerdir (Ansari *et al.*, 2012).

Başka bir araştırmada ise, farklı destekler (cam mikro küreler, naylon 6/6 peletler ve PAN boncuklar) üzerinde kovalent olarak immobilize edilen bir pektik enzim karışımının katalitik davranışı, elma suyunu simüle eden bir pektin sulu çözeltisi ile analiz edilmiştir. Pektin hidrolizinin gerçekleştirildiği hız sabiti, ilk viskozitenin %50'sindeki azalmaya ulaşıldığı zaman (τ_{50}) ve tam depektinizasyon elde etmek için gereken süre parametreleri araştırılmıştır. PAN boncukları destek materyali ile hazırlanan sistem en iyi katalitik sonucu vermiş ve sıcaklık ve pH deneysel çalışmaları yapılmıştır. PAN boncukları ile hazırlanmış veya akışkanlaştırılmış reaktör verimleri, elma suyunun dolaşım akış hızı ile kıyaslanmıştır. pH 4, sıcaklık 50 °C ve PAN boncuklarının hacmi 20 cm³ olarak bulmuşlardır. İlk pektin konsantrasyonu, elma suyu örneğinde bulunan konsantrasyonu olduğunu ifade etmişlerdir (Diano *et al.*, 2008).

Agrobacterium radiobacter'den DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan ekstraselüler pektin liyaz (PL) enzimini 21 kat saflaştırarak karakterizasyonunu yapmışlardır. Saflaştırılan PL enziminin molekül ağırlığı 67 kDa olarak tespit edilmiş ve saflaştırılan pektin liyaz enziminin optimum pH 8 ve optimum sıcaklığı 60 °C olarak belirlemişlerdir (Yıldırım vd., 2015).

Pektin liyaz (PL), toksik metanolü serbest bırakmadan ve meyve sularının spesifik aromasından sorumlu ester içeriğini bozmadan, yüksek oranda metillenmiş pektini doğrudan hidrolize edebilen tek pektinazdır. PL aktivitesi kolorimetrik deney ile teyit edilmiştir. Eksprese edilen PL'nin çözünürlük verimini arttırmak için, indüksiyon sıcaklığının, konakçı suşunun ve ekspresyon seviyesinin etkileri optimize edilmiştir. Maksimum fonksiyonel PL üretimi, 16 saat boyunca 30° C'de ve 150 rpm'de 0,4 mM IPTG ile indüksiyondan sonra elde edilmiştir. İlginç bir şekilde, enzimin aktif konformasyonu için gerekli disülfid bağlarının oluşumunu destekleyen oksitlenmiş bir sitoplazmaya sahip olan Origami konakçı suşunun kullanımı, rekombinant PL'nin çözünür aktif formunun verimini önemli ölçüde geliştirmiştir. Bu PL, HisTrap afinite kolon kromatografisi kullanılarak tek aşamalı bir saflaştırma yoluyla başarıyla saflaştırılmıştır. Bu çalışma, PL ifadesini Origami türüne aktaran ilk çalışmadır. Alternatif olarak, inklüzyon cisimcikleri izole edilmiş, yüksek üre konsantrasyonu ile denatüre edilmiş ve ardışık diyaliz ile kademeli olarak yeniden katlanmış, bu da çözünür ve aktif forma dönüşmelerine yol açmıştır (Sassi *et al.*, 2017).

Pektin liyaz (PL) enzimleri bitki hücre duvarının parçalanmasında görevli olan önemli enzimlerdir. *Colletotrichum*, patojen konakçı etkileşimlerini, adaptasyonlarını ve PL evrimini

incelenmesini sağlayan bir mantar çeşididir. *Colletotrichum*'dan saflaştırılan PL farklı yöntemler kullanılarak ayrı ayrı bölgelerde pozitif seleksiyon analizi, oligosakarit bağlama bölgesinde pozitif seçim kanıtı ile üç kodonun ve substrat ile etkileşimi sağlayabilecek antiparalel tabaka üzerinde iki kodonun tanımlanmasına izin vermiş. Protein yüzeyindeki yedi kodon, diğer enzimlerde önerildiği gibi, esas olarak PL'lerin çevresel sarmallarında, bitki savunmalarından kaçmada önemli bir işleve sahip olabilir. Sonuçlarına göre, genetik çoğaltma olaylarının atalardan kalma soylarda meydana gelmesi, ardından muhtemelen konakçı hücre duvarının bileşimindeki farklılıklardan etkilenen genetik çeşitlenme ve gen kaybı olaylarının meydana gelmesi mümkün olduğunu ifade etmişlerdir. Bu çalışma, bitki savunmalarından kaçınma ve biyoteknolojik amaçlarla önemli olabilecek alanların incelenmesi için bir başlangıç noktasını temsil etmektedir (Márquez *et al.*, 2017).

Lignoselüloz, bitki hücre duvarının ana bileşeni olan ve yapısında pektin, selüloz, organik ve inorganik bileşenleri bulunduran yenilenebilir hammaddedir. Lignoselüloz bileşenlerinden biri pektindir. Pektin iki temel yapıdan oluşur: "düz" bölge ve "dallanmış" bölge. Düz bölge olarak adlandırılan yapı metil ve asetil grupları ile oluşan α - (1,4) bağları ile bağlanan galakturonik asit kalıntısının polimeridir. Dallanmış bölge ise karmaşık bir yapıda ksilogalakturonan ve ramnogalakturonans I ve II içermektedir. Pektini (pektinazları) indirgeyen enzimler arasında pektin liyaz bulunur. Bu enzim, yüksek ölçüde esterlenmiş homogalakturonan üzerinde etki ederek, 4,5-doymamış ürünlerin oluşumu ile galakturonik asidin metoksillenmiş kalıntıları arasındaki α - (1/4) glikosidik bağların bölünmesini katalize eder. *Penicillium purpurogenum*'dan bir pektin liyazının cDNA'sı ve geni sekanslanmış ve cDNA *Pichia pastorise* ekspres edilmiştir. Gen 1334 pb uzunluğunda, üç introna sahip ve 376 amino asit kalıntısından oluşan bir proteini kodlar. *Penicillium purpurogenum*'dan saflaştırılan pektin liyaz enzimi SDS-PAGE elektroforez yöntemi ile molekül ağırlığı 45 kDa olarak hesaplamışlardır. Yüksek derecede esterlenmiş pektin üzerinde aktif ve ≥ 85 esterleşme derecesi ile pektinin viskozitesini %40 azalttığını hesaplamışlar. Rekombinant enzim için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 6,0 ve 50 °C olarak belirlenmiş ve 3 saat sıcaklığa maruz kaldığında 50 °C'ye kadar stabil kalmıştır. Saflaştırılmış bir pektin liyaz, pektin bozunmasında toksik metanolün serbestleşmesinin önlenmesi gereken gıda endüstrisi gibi biyoteknolojik uygulamalarda faydalı olabileceğini ifade etmişlerdir (Perez-Fuentes *et al.*, 2014).

Bu çalışmada, *Neurospora crassa* ile fermente edilmiş turuncgil kabuğu atığından poligalakturonaz (PG) ve pektin liyazın (PL) yeni fraksiyonları saflaştırılmıştır. Çeşitli fermantasyon parametreleri arasındaki derinlemesine etkileşimleri incelemek için yanıt yüzeyi metodolojisinden merkezi bir bileşik tasarım kullanmışlardır. PG ve PL enzimleri homojen

olarak saflaştırılmış ve çapraz bağlama yöntemi ile kitosan ve glutaraldehit bağlantıları ile yüzeye immobilize etmişlerdir. PG ve PL enzimlerinin Sephadex G-100 kolon kromatografisinden geçirildikten sonra 12,3 ve 6,52 kat saflaştırılarak spesifik aktivitelerinde artış olduğunu hesaplamışlardır. İmmobilizasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini FT-IR spektroskopisi ile desteklemişlerdir. Serbest parçaların katalitik karakterizasyonu FP-PG ve FP-PL ve CHI- immobilize parçalar gibi ve CHI-PG ve CHI-PL gibi pH, termal davranış, Michaelis Menten kinetik sabitleri, etilendiamintetraasetik asit ve Sodyum dodesil sülfat içeren şelatlama ajanları ve iki değerlikli ajanlar gibi inhibitörler/aktivatörler dahil olmak üzere çeşitli parametreler kullanılarak incelemişlerdir. İmmobilize fraksiyonlar daha geniş pH (4-9) ve sıcaklık (45-85 °C) aralığında stabil kalmıştır. Katalitik K_m sabiti FP-PG, FP-PL, CHI-PG ve CHI-PL için sırasıyla 0,20, 0,13, 0,14 ve 0,10 mg/mL ve V_{max} değeri 204, 154, 208 ve 143 U/mL/dak olarak hesaplanmış. Serbest ve immobilize enzimlerinin V_{max} ve K_m değerleri arasındaki ihmal edilebilir fark, konformasyonel esnekliğin korunduğunu gözlemlemişlerdir. CHI-PG ve CHI-PL immobilize enzimleri 7 kez tekrar tekrar kullanımdan sonra ilk aktivitesinin en az %75'ini korumuştur (Bibi *et al.*, 2017).

Pektinazlar veya pektinolitik enzimler, pektik maddeleri hidrolize eder. Gıdalarda kullanılan enzimler dünya üzerindeki satışlarda %25 oranına sahiptir. Pektinaz enzimleri en fazla mantarlar, bakteriler ve bitkilerden saflaştırılmaktadır. Poligalakturonazlar, protopektinazlar, liyazlar ve pektin esterazlar detaylı olarak incelenen pektinolitik enzimler arasındadır. Protopektinazlar, protopektinin çözünürlüğünü katalize eder. Poligalakturonazlar su eklenmesiyle poligalakturonik asit zincirini hidrolize eder. Pektinolitik enzimler arasında en fazla poligalakturonazlar bulunur. Liyazlar, galakturonik asit polimerin trans-elimine edici bölünmesini katalize eder. Pektinesterazlar, pektin omurgasının metil ester bağlarını de-esterleyerek pektinleri ve metanolü serbest bırakır. Pektinolitik enzimler, meyve suyu ekstraksiyonunda ve berraklaştırılmasında, pamuğun ovulmasında, bitki liflerinin zamkının giderilmesinde, atık su arıtmada, bitkisel yağ ekstraksiyonunda, çay ve kahve fermentasyonlarında, kağıdın ağartılmasında kümes hayvanları yem katkı maddeleri ve alkollü içecekler ve gıda endüstrilerinde geniş uygulamaları ile günümüz biyoteknolojik çağda büyük önem taşımaktadır (Jayani *et al.*, 2005).

Tek karbon kaynağı olarak pektin kullanarak pektin liyaz ve pektat liyazı üretebilen *Debaryomyces nepalensis*'den daha önce izole edilmiştir. Bu enzimlerin aktivitesini etkileyen parametreler, kimyasal (substrat ve enzim miktarı) ve fiziksel (reaksiyon karışımının pH'ı ve inkübasyon sıcaklığı) olarak ikiye ayrılır. Bu parametrelerin pektin liyaz ve pektat liyaz üzerindeki etkileri incelenmiştir. Substrat ve enzim miktarının optimal koşulları pektin liyaz

için 545 µl (~1 g/L pektin) ve 123 µl ve pektat liyaz için 707 µl (~1,1 g/L poligalakturonik asit) ve 96 µl olarak bulunmuştur. Pektin liyaz ve pektat liyaz enziminin optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 6,4 – 35 °C ve 7,5 – 32 °C olarak ölçülmüştür. Optimizasyondan sonra, pektin liyaz ve pektat liyaz aktivitesi sırasıyla 1,3 ve 1,4 kat arttığını hesaplamışlardır (Gummadi and Kumar, 2006).

Pektin liyaz, orta lamellerde ve yüksek bitkilerin birincil hücre duvarlarında yapısal polisakkaritler olarak oluşan pektik maddelere etki eder. Pektin liyaz enziminin kağıt, gıda endüstrisi ve tekstilde uygulamaları mevcuttur. Bu enzimin yeni uygulamaları ortaya çıktığından, enzimin önemli yönlerini, özellikle katalitik etkinliği ve olası kaynakları araştırmak için bilimsel bir ihtiyaç vardır. Pektin liyazı üzerine araştırma çalışması son altmış yıldır yapılmasına rağmen, literatürde şu ana kadar pektin liyaz üzerine özel bir inceleme yoktur. Bu çalışmada, pektin substratının kısa bir açıklaması, pektin liyaz ile ilgili enzimler, test prosedürleri, kaynaklar, saflaştırma ve karakterizasyon, yapısal yönler, substrat özgüllüğü, moleküler biyoloji, biyoteknolojik uygulamalar ve pektin liyazların gelecekteki beklentileridir (Yadav *et al.*, 2009).

Pektinolitik genlerin ifadesi, büyüme ortamında doğal indükleyici pektin eksikse, pektin liyaz (PL) üretimini sınırlayan katabolik bastırma ile düzenlenir. Burada, katabolit bastırmaya direnç gösteren ve aşırı PL üreten 2-deoksi-D-glikoza (DG) dirençli *Penicillium griseoroseum* mutantlarının izolasyonunu bildirmişlerdir. 3 spontan ve 9 UV-indüklü mutant elde edilmiş. Mutantlar, pektinaz agar plakalarında pektinaz üretimi için analiz edildi ve beş mutant ve kantitatif deney için yabancı tipten daha büyük temizleme bölgeleri gösteren iki sektör seçilmiştir. Yabancı tipten daha yüksek PL üretimi bulunmasına rağmen, mutantların çoğu için fenotip istikrarsızlığı gözlemlenmiş ve seçici olmayan ortama transferlerden sonra DG direnci artık kaybolmuştur. DG-direnç fenotipini korumasıyla sadece M03 ve M04 mutantları stabilitesini korumuştur. Pektinli veya pektinsiz glikoz içeren sıvı ortamda 120 saat büyürken, her iki mutant da daha yüksek PL üretimi göstermiştir. Ortamda glikoz bulunması halinde mutant M03, yabancı tipten 7,8 kat daha fazla PL ürettiğini ifade etmişlerdir. Fenotipik stabilitesi ve aşırı PL üretimi nedeniyle mutant M03, endüstriyel uygulamalar için potansiyel sunacağını ifade etmişlerdir (Lima *et al.*, 2017).

Bu çalışma, pektinaz üretimini artırmak için mantar hücresinin immobilizasyonda bir destek matriksi olarak süngerin yeni kullanımını araştırmışlar. Batık kültür fermantasyon sisteminde pektinaz üretimi için immobilize balon daldırmalı fermantasyon sisteminde pektinaz üretimi için immobilize *Aspergillus niger* HFD5A-1 hücrelerinde naylon sünger küpleri kullanmışlardır. İmmobilize hücrenin sünger küplerindeki enzim aktivitesi, serbest

hücrelere kıyasla daha yüksek aktivite vermiştir. Kültür durumu için çeşitli fiziksel parametreler, pektinaz üretimi üzerindeki etkilerini değerlendirmek için incelemişlerdir. Elde edilen maksimum enzim aktivitesi, 6 bulaşık sünger küpü, 1×10^7 spor/mL inokulum boyutu, 150 rpm karıştırma hızı ve 30 °C'de inkübe edilen optimize parametreler kullanılarak kültivasyonun 6. gününde 11,05 U/mL olmuştur. Naylon sünger küplerinin kullanılması, serbest hücrelere (2,54 U/mL) kıyasla yaklaşık %335,0 pektinaz üretimi (11,05 U/mL) artışı sağlamıştır. Bu nedenle sonuçlar, sünger küplerinin, daldırılmış fermantasyonda daha yüksek enzim üretimi için mantar hücrelerini immobilize hale getirmek için uygun bir taşıyıcı olabileceğini gösterdiğini ifade etmişlerdir (Darah *et al.*, 2014).

Bacillus pumilus (P9)'tan katı hal fermentasyonu ile pektin liyaz (EC 4.2.2.10) enzimi ekstraselüler olarak elde etmişlerdir. Pektin liyaz enzimi, DEAE-selüloz anyon değişim kolon kromatografisi kullanılarak 36.36 kat saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak enzimin molekül ağırlığı 25 kDa olarak bulunmuştur. SDS-PAGE elektroforez yöntemi ile molekül ağırlığı tekrar kontrol edilmiştir. PL enziminin optimum pH ve sıcaklık sonuçları sırasıyla pH 6.0 ve 60 °C olarak ölçülmüştür. Pektin liyaz enzimi çoğunlukla 40 °C'de stabil kalmıştır. Aktivitesi 60 °C'de 1 saatte %50 ve 50 °C'de 4 saatte %40 azalmıştır. V_{max} ve K_m sırasıyla 0,298 mg/mL ve 132.6 μ mol/L.dak olarak hesaplanmıştır. 10 mM konsantrasyonda Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Hg_2^{2+} , Fe^{2+} ve EDTA, L-sistein, askorbik asit ve β -merkaptetanölün varlığı, saflaştırılmış enzimin pektin liyazı önemli ölçüde artırmıştır. Meyve sularını elde etmek için saflaştırılmış pektin liyaz enzimi kullanılmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında meyve sularının veriminin önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir (Nadaroğlu *et al.*, 2010).

Brevibacillus borstelensis P35 (GenBank numarası: FJ417406) tarafından salgılanan bir alkalın pektin liyaz (PL) (EC 4.2.2.10), amonyum sülfat fraksiyonu, DEAE-selüloz anyon değişim kromatografisi ve Sephadex G-150 jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak saflaştırılmış. *Brevibacillus borstelensis* P35'den saflaştırılan PL enziminin pektin liyaz enzim aktivitesi deneyinde optimum pH 8, optimum sıcaklık ise 60 °C olarak ölçülmüştür. Enzim 1 saat boyunca sıcaklığa maruz kaldığında 60 °C'ye kadar aktivite kaybı olmadığını kaydetmişlerdir. PL enziminin K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,625 mg/ml ve 126.32 s^{-1} olarak hesaplanmıştır. Moleküler ağırlığın 36 ± 01 kDa olduğu bulunmuştur. 10 mM konsantrasyonda Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Hg_2^{2+} , Fe^{2+} ve EDTA, L-sistein, askorbik asit varlığı, saflaştırılmış enzimin pektin liyaz aktivitesini önemli ölçüde arttırmıştır. Laboratuvar denemeleri sırasında, *B. borstelensis*'ten PL'nin (P35) meyve suyu ve yağ ekstraksiyonunun

üretimi ve arıtılmasında başarılı bir şekilde uygulanabileceği göstermişlerdir (Demir *et al.*, 2014)

Hücre dışı pektin liyaz (PL) (EC 4.2.2.10), katı hal fermantasyonunda *Geobacillus stearothermophilus* Ah22 tarafından üretilmiştir. PL enzimi, DEAE-selüloz anyon değişim kolon kromatografisi ile 40,8 kat saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak enzimin molekül ağırlığı 36 kDa olarak bulunmuştur. SDS-PAGE elektroforez yöntemi ile molekül ağırlığı tekrar kontrol edilmiştir. *Geobacillus stearothermophilus* Ah22'den saflaştırılan PL enziminin pektin liyaz enzim aktivitesi deneyinde optimum pH 8, optimum sıcaklık ise 60°C olarak ölçülmüştür. PL enzimi 40°C'de stabilitesini koruduğunu ifade etmişlerdir. Aktivitesi, 60°C'de 2 saat sonra %50 ve 50°C'de 6 saat sonra %60 azalmıştır. V_{max} ve K_m sırasıyla 0,47 mg/mL ve 355,3 μ mol/L dakika olarak hesaplanmıştır. 10 mM Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Hg_2^{2+} , Fe^{2+} ve EDTA, L-sistein ve askorbik asidin varlığı enzim aktivitesini önemli ölçüde artırmıştır. Saflaştırılmış PL enzimi, meyve sularının üretiminde kullanıldı; meyve suyu verimi, kontrollere kıyasla önemli ölçüde arttığını ifade etmişlerdir (Demir *et al.*, 2011).

Aspergillus flavus MTCC 7589 bakterisinden saflaştırılan alkali pektin liyaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE selüloz üzerinde anyon değişim kromatografisi ve Sephadex G-100 üzerinde jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak 3 aşamada homojenliğe kadar saflaştırılmıştır. Optimum koşulları belirlemek için aktivite sonucunda pH 8 sıcaklık 50 °C olarak belirlenmiştir. Enzimin pH 4,0–10,0 aralığında 24 saat stabil olduğu bulunmuştur. 1 saat boyunca sıcaklığa maruz kaldığında enzim 50 °C'ye kadar aktivite kaybetmez. 0,1-2,0 M aralığında amonyum sülfat eklenmesi, enzimin termostabilitesini artırarak 0,6 ve 1,8 M aralığında amonyum sülfat 60 ve 70 °C'de tam stabilite sağlamıştır. Enzimin V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 52,2 s^{-1} ve 0,59 mg/mL olarak hesaplamışlardır. Enzimin molekül ağırlığı 38 kDa olarak bulmuşlardır. Saflaştırılmış enzim, *Crotalaria juncea* liflerinin çürütülmesinde etkinlik göstermiştir (Yadav *et al.*, 2008).

Bu çalışma, *Aspergillus oryzae* mantar suşunun pektin liyaz üretim potansiyeli üzerindeki etkisini araştırmayı amaçlamaktadır. *A. oryzae* enzim profili, katı hal fermentasyon koşulları altında limon kabuğu atığı üzerinde inkübasyonun 3. gününden sonra en yüksek pektin liyaz aktivitesini göstermiştir. *A. oryzae*'nin pektin liyaz sentezleme kapasitesini optimal düzeyde indüklemek için fiziksel ve beslenme parametreleri dahil çeşitli kültür değişkenleri klasik optimizasyon tekniği kullanılarak optimize edilmiştir. Bu nedenle, fermentasyon prosesi optimizasyonu yoluyla, limon kabuğu atığının fermentasyon ortamı *A. oryzae*'nin 5 mL spor süspansiyonu ile aşılınması durumunda, pektin liyaz üretimi büyük

ölçüde 875 U/mL seviyesine kadar indüklenmiştir. Maksimum pektin liyaz verimi için optimum fermentasyon koşulları; optimum pH 5, %70 nem seviyesi ve 40 °C'de ek olarak hazır karbon kaynağı olarak %1 steril glikoz çözeltisi ve ucuz bir nitrojen takviyesi olarak %0,2 maya özütü ile inkübe edildi (%1). Şimdiye kadar mevcut araştırmada elde edilen sonuçlar, kültür koşullarının *A. oryzae*'nin pektin liyaz üretim potansiyeli üzerinde büyük etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Koser *et al.*, 2014).

Son yıllarda geleneksel immobilizasyon yöntemlerine karşı organik-inorganik hibrit nanoçiçek teknolojisi etkili bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Bu yöntem, basit sentezleri, yüksek verimlilikleri, biyomolekül stabilitesini, aktivitesini ve hatta seçiciliği artırma konusundaki büyük umutları nedeniyle, biyomolekül immobilizasyonu için potansiyel bir matriks olarak kullanılması konusunda dikkate değer bulunmuştur. Son yıllarda, potansiyel uygulamaları olan biyomolekül-inorganik hibrit nanoçiçek geliştirmek için bu konuya odaklanan pek çok araştırma vardır. Bu çalışmada organik-inorganik hibrit nanoçiçeklerinin optimizasyonu uygulama alanları tartışılmıştır. Bu nanoçiçeklerin rasyonel tasarımına yönelik güncel gelişmelerdeki eğilimler tanımlanmıştır (Cui and Jia, 2017).

Glikozun hassas tespiti için yeni bir mikroçiçek kağıt tabanlı analitik cihaz (μ PAD) biyosensör geliştirilmiştir. Bu biyosensörün üretiminde glikoz oksidaz (GOx) ve yaban turpu peroksidazından (HRP) enzimleri ve inorganik madde olarak $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ nanokristalleri kullanılmıştır. Hibrit nanokompleks'in, bu iki enzimin biyoyumlu bir ortamda birlikte immobilizasyonuna izin veren çiçeğe benzer bir yapı sergilediği bulunmuştur. Bu nanoçiçekler sadece enzimlerin aktivitesini korumak ve stabilitesini artırmakla kalmaz, aynı zamanda iki enzim arasında substratların taşınmasında kolaylaştırır. Biyosensörün, 25 μM 'lik bir saptama sınırı (LOD) ile 0,1–10 mM konsantrasyon aralığında hızlı ve hassas bir şekilde glukoz ölçümü sağladığı gösterilmiştir. Aynı zamanda, insan serumu ve tam kan örneklerinde kolorimetrik kantitatif glikoz tespitine uygulanabilir olduğu gösterilmiş, bu da klinik uygulamalar için potansiyelini belirtmektedir (Zhu *et al.*, 2017).

Katalitik aktivitelerini ve kararlılığını arttırmak için enzimlerin immobilizasyonunda birçok farklı mikro ve nano boyutlu malzemeler kullanılmıştır. Geleneksel immobilizasyon yöntemleri ile immobilize ve serbest enzimler kıyaslandığında gelişmiş bir stabilite sergilemişlerdir. Son zamanlarda, olağanüstü katalitik aktivite ve stabilitesiyle çiçek benzeri organik-inorganik hibrit nano yapıların sentezinde mükemmel bir immobilizasyon yaklaşımı keşfedilmiştir. Yeni geliştirilen immobilizasyon tekniğinde organik ve inorganik bileşenlerden oluşmaktadır. Organik bileşenler olarak proteinler, DNA yapıları, inorganik bileşenler olarak metal iyonları kullanılarak hibrit nanoçiçekler oluşturulmuştur. Hibrit

nanoçiçeklerin serbest ve geleneksel immobilize yöntemleriyle kıyaslandığında deneysel koşulların (pH, sıcaklık, tuz konsantrasyonu vb.) geniş oranda daha yüksek katalitik aktivite ve stabilite gösterdiği ispatlanmıştır (Altınkaynak *et al.*, 2016).

Enzimlerin immobilizasyonunda katalitik aktivitelerini artırmak için nanomateriyaller ve çeşitli destek materyalleri kullanılmasına rağmen immobilize enzimlerin birçoğu serbest enzimlere göre azaltılmış aktivite göstermişlerdir. Bu çalışmada ilk kez, büyük ölçüde geliştirilmiş aktivite ve stabiliteye sahip çiçeğe benzer hibrit nanoyapıları sentezlemek için demir iyonları (Fe^{2+}) ve yaban turpu peroksidaz (HRP) enzimini birlikte kullanılarak hem katalitik aktivite hem de stabilitedeki gelişmelerin bir açıklamasını rapor etmişlerdir. Fe^{2+} ve yaban turpu peroksidaz enziminden oluşan hibrit nanoçiçeğin serbest yaban turpu peroksidaz enzimine göre $+4^{\circ}C$ depolandığında $\sim\%512$ ve oda şartlarında depolandığında $\sim\%710$ katalitik aktivite sergilediği gösterilmiştir. $+4^{\circ}C$ 'de 30 gün boyunca depolanan Fe^{2+} ve yaban turpu peroksidaz enziminden oluşan hibrit nanoçiçeği ilk aktivitesinin $\%97.1$ 'ini koruduğunu ifade etmişlerdir. Oda şartlarında depolanan hibrit nanoçiçek ise ilk aktivitesinin $\%90$ 'ını koruduğunu ölçmüşlerdir. Ayrıca, aynı koşullar altında, $+4^{\circ}C$ ve oda şartlarında depolanan serbest HRP enzimleri, aktivitelerinin sırasıyla $\%68$ ve $\%91$ 'ini kaybetmiştir. HNF aktivitelerindeki büyük artışların nano ölçekli boyutta yüksek bölgesel HRP konsantrasyonu, uygun HRP konformasyonu, daha az kütle transferi sınırlamaları ve HRP için bir aktivatör olarak Fe^{2+} iyonunun rolü ile ilişkili olduğunu iddia etmişlerdir (Ocsoy *et al.*, 2015).

Enzim-inorganik hibrit nanoçiçeklerin sentezi ve bunların yüksek verimli protein parçalanması için immobilize α -kimotripsin (ChT) reaktörü (IMER) olarak uygulanması için basit bir yaklaşım açıklanmıştır. Hibrit nanoçiçekler, inorganik bileşen olarak kalsiyum fosfat ($Ca_3(PO_4)_2$) ve organik bileşen olarak ChT kullanılarak sulu çözelti içinde oda sıcaklığında sentezlenmiştir. Enzim gömülü hibrit nanoçiçeklerin oluşumunda reaksiyon parametrelerinin etkileri ve büyüme mekanizmaları sistematik olarak incelenmiştir. N-benzoil-L-tirozin etil esterinin reaksiyonu gözlemlenerek, immobilize α -kimotripsinin enzim aktivitesi ölçülerek aktivitede $\%266$ artış görmüşlerdir. Böyle bir nanoreaktörün performansı, sığır serum albümini (BSA) ve insan serum albüminini (HSA) parçalayarak, nanoçiçek bazlı parçalanma için $\%48$, serbest enzim $\%34$ ürün serileri ile bu parçalanmaların kesin olarak tanımlanması gösterilmiştir. Önceki durumda BSA ve HSA'nın sindirim süresi 2 dakikadan az iken, ikinci durumda yaklaşık $1/360$ oranında gerçekleştirilmiştir (12 saat). Ayrıca, nanoçiçeklerin tekrarlanan sekiz kullanımdan sonra bile aktiviteleri az miktarda azalmış ve umut verici bir stabilite göstermiştir. Ek olarak, IMER tabanlı hibrit nanoçiçek karmaşık bir insan kaynaklı

numunelerin parçalanmasına uygulanabileceğini ve proteom analizi için büyük umut vaat ettiğini ifade etmişlerdir (Yin *et al.*, 2015).

Alcaligenes sp.'den termofilik lipaz QLM $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ bazlı inorganik hibrit nanoçiçek'te biyomimetik mineralizasyon yoluyla başarıyla immobilize edilmiştir. Immobilize enzimin optimal sıcaklığı (65 °C) ve pH (8.0), daha sonra p-nitrofenil kaprilatın hidrolizi izlenerek belirlenmiştir. Ayrıca, serbest enzimle karşılaştırıldığında, inorganik hibrit nanoçiçek içindeki immobilize enzim, nanoçiçek kabuğunun koruyucu etkisine atfedilerek termal, pH ve metal iyonlarına karşı gelişmiş stabilite sergilemiştir. Ayrıca, immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliğini göstermek için 8 defa kullanılarak ve 30 gün boyunca oda sıcaklığında depolandıktan sonra enzim aktivitesinde çok az azalma ile stabilitesini koruduğunu ifade etmişlerdir. Genel olarak, inorganik hibrit nanoçiçeğe immobilizasyon uygun aktivite, stabilite ve yeniden kullanılabilirlik ile immobilize enzimlerin hazırlanması için kolay ve etkili bir yaklaşım sağlamış ve bu nedenle strateji, gelecekteki biyokatalitik uygulamalar için ideal katalizörlerin geliştirilmesinde büyük potansiyel göstereceğini ifade etmişlerdir (Liu *et al.*, 2021).

Bakır-protein hibrit nanoçiçekleri nanofiber bir zarın yüzeyinde oluşturulmuştur. Enzimli inorganik nanoçiçekler kısmen enzimin inorganik kristaller tarafından korunmasından kaynaklanan gelişmiş dayanıklılık ve kararlılık sergilemiştir. Nanofiber membran üzerindeki yüksek özgül yüzey alanı ve bol fonksiyonel Cu^{2+} grupları, $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -protein nanoçiçeklerin yoğun ve kompakt büyümesini sağlamıştır. Bakır bazlı inorganik protein nanoçiçeklerin yapısı, morfolojisi ve kristalizasyonu analiz edilmiş ve bu da bizi hibrit nanoçiçeklerin bir oluşum mekanizması önermemize yol açmıştır. Nanofiber zar üzerindeki bakır bazlı inorganik protein nanoçiçeklerin bileşimi ve yapısı, nanofiber membranın yapısı, mineralleştirme solüsyonlarının formülasyonu, protein konsantrasyonu ve büyüme süresi değiştirilerek kontrol edilebileceğini ifade etmişlerdir. Bakır bazlı inorganik-protein nanoçiçeklerin nano ölçekli fibröz membran üzerinde yapımı, biyomimetik çok düzeyli yapı malzemeler hazırlamak için yeni olanaklar sağlamış ve bunları biyosensör, biyokataliz, biyomühendislik ve biyo-cihazlar için ideal bir malzeme haline getirmiştir (Li *et al.*, 2016).

Çiçek benzeri kitosan/kalsiyum pirofosfat hibrid mikropartikülleri (mikroçiçekler), biyomimetik mineralizasyon ile iyonotropik jelasyonu birleştirerek kolay bir tek basamak yaklaşımı kullanılarak hazırlanmıştır. Kitosan–tripolifosfat (CS-TPP) iyonotropik jelasyon yoluyla nanoçiçekleri sentezlemişler ve ortamda fazla kalan TPP kısmen pirofosfat iyonlarına ($\text{P}_2\text{O}_7^{-4}$) hidrolize edilmiştir. CaCl_2 'nin eklenmesiyle, CS-TPP nanoçiçekleri, $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ *in situ*

minerilizasyonuna sebep olan ve mikroçipeklerin toplanmasını ve onun gelişimini yönlendiren çok yönlü bir şablon görevi görmüştür. İyonotropik jelasyon yöntemi ile sentezlenen mikroçipeklerin %23'ü CS-TPP nanoçipekleri ve %77'si $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ kristallerinden oluşmuştur. Mezoporlar (3.7 ve 11.2 nm) ve makro gözenekler mikro gözeneklerde birlikte gözenekli ve hiyerarşik yapıları göstermiştir. Mikro filtreler yüksek verimlilikte boya adsorbsiyonunda ve enzimatik katalizde kullanılmıştır. Özellikle, kongo kırmızısı için yüksek bir adsorpsiyon kapasitesi 520 mg.g^{-1} elde edilmiştir. İmmobilize enzimin, serbest enzim ile karşılaştırıldığında yaklaşık %85 oranında katalitik aktiviteye sahip olduğunu hesaplamışlardır. Kolay tek basamak hazırlama işlemi, gözenekli hibrit mikroçipeklerin geniş uygulamalarını sağlamıştır (Wang *et al.*, 2014).

Hua *et al.*, 2016 yılında yaptıkları bir çalışmada *Candida antarctica*'dan saflaştırılan lipaz B (CALB) inorganik nanoçipek kompozitlerle kapsüllenenek serbest lipaza göre aktivitesinin %92'sini koruduğunu rapor etmiştir. Şaşırtıcı bir şekilde, CALB-inorganik kristal nanoçipekler, organik ortamda gerçekleştirilen yağ asitlerinin kemoenzimatik epoksidasyonu ile gösterildiği gibi, sırasıyla doğal lipaz ve ticari immobilize lipaz Novozym 435'den 25 ve 4 kat daha yüksek aktivite sergilemiştir.

Bu çalışmada, kolay bir yaklaşımla α -asetolaktat dekarboksilazı (ALDC) immobilize etmek için yeni nanoçipek/aljinat mikro boncuklar sentezlenmiştir. Tipik olarak, ALDC önce enzim inorganik hibrit nanoçipek ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -ALDC) oluşturmak için $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ile birlikte çöktürülmüş ve daha sonra mikrometre boyutlu parçacıklar ve nano ölçekli çiçek benzeri yapıları içeren nanoçipekler aljinat jel boncuklarında ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -ALDC) @Alg tutulmuştur. Serbest ALDC ve $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -ALDC nanoçipekleri ile karşılaştırıldığında, mikro boncuklar büyük ölçüde iyileştirilmiş geri dönüştürülebilirlik ve stabilite gerçekleştirirken, bu arada serbest ALDC'ye kıyasla aktivitenin %98'ini korumuştur. Ayrıca, immobilize enzim, diasetil oluşumunu önlemek, biranın tat sorununu çözmek ve biranın olgunlaşma süresini kısaltmak için 300 L'lik bir bira fermentasyon tankında kullanılabileceğini, böylece bira mayalama endüstrisinde büyük bir potansiyel uygulama sergileyeceğini ifade etmişlerdir (Zhao *et al.*, 2017).

Allosterik etkiye dayalı olarak CaHPO_4 - α -amilaz hibrit nanobiyokatalitik sistemin rasyonel bir tasarımını ve belirli nanomateryallerde belirli enzimler immobilize edildiğinde katalitik aktivitedeki artışını açıklamışlardır. Nanoçipekler, nanoplate ve paralel altıyüzlüler gibi üç farklı yapıda sulu çözelti içerisinde kalsifikasyon yaklaşımı ile yeni nanobiyokatalitik sistemleri geliştirmişlerdir. Bu yeni geliştirilen nanobiyokatalitik sistem enzim aktivitesini ve Ca^{2+} içeren/içermeyen serbest formdaki α -amilaz enzimini inceleyerek, bu nanoyapıların

allosterik regülasyonu ve morfolojisinin enzim aktivitesini etkileyip etkilemediğini incelemişlerdir. CaHPO_4 - α -amilaz hibrit nanoçiçekler hem allosterik etki hemde yapısından etkili enzimatik aktivite göstermiştir. Bonus olarak, geliştirilen yeni sistemin, serbest α -amilaz ve Ca^{2+} 'dan daha yüksek stabilite ve dayanıklılığa sahip olduğunu görmüşlerdir (Wang *et al.*, 2013).

Yeni geliştirilen çiçek benzeri hibrit nanopartikül sınıfı olan organik-inorganik hibrit nanoçiçekler basit sentezleri, yüksek verimlilikleri ve enzim stabilize etme kabiliyetleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Bu makale, hibrit nanoçiçeklerin türlerini, yapısal özelliklerini, oluşum mekanizmalarını ve biyo-ilişkili uygulamalarını ayrıntılı olarak ele almıştır. Nanoçiçek oluşumunun ara yüzey mekanizması üç adımda incelenmiştir: birincisi, metal iyonu ve organik madde kombinasyonu; ikincisi, yaprakların oluşumu; üçüncü olarak, nanoçiçeklerin büyümesi. Burada yapılan açıklamalar, çok sayıda hibrit nanoçiçeklerin ileriye dönük gelişimi için hibrit nanoçiçeklerin sentezine yönelik yenilikçi yaklaşımların geliştirilmesinde kullanılabilir. Biyoteknoloji endüstrisinde, tıpta, sensörlerde ve katalizde hibrit nanoçiçeklerin gelecekteki beklentileri de tartışılmaktadır (Lee *et al.*, 2015).

Daha önce yapılmış çalışmada organik bileşenler olarak lipaz ve papain, inorganik bileşen olarak $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ kullanılarak hiyerarşik çiçeğe benzer yapılar sentezlemişlerdir. Hibrit nanoçiçeklerin karakterizasyonu FT-IR, XRD ve EDX spektroskopisi ile yapmışlardır. Nanoçiçekler için enzim konsantrasyonu, pH ve sıcaklık dahil olmak üzere sentez koşullarını değiştirerek, nanoçiçeğin morfolojisini ve enzim aktivitesini kontrol edilebileceğini kanıtlamışlardır. Nanoçiçek boyutunu, enzim konsantrasyonu ve sıcaklık etkilerken, pH sadece yaprak yoğunluğunu etkilediğini ifade etmişlerdir. Uygun enzim içeriği çiçek boyutu ve çiçek yoğunluğu, yüksek enzimatik aktivite için kritik faktörlerdir (Li *et al.*, 2016).

Ham soya fasulyesi peroksidaz (SBP)'nın saflaştırması ve organik-inorganik nanoçiçekleri sentezlemek için yeni bir yöntem sunmuşlardır. Yüzlerce nanoyaprak içeren hiyerarşik bir çiçeğe benzer küresel yapı, organik bileşen olarak ham SBP ve inorganik bileşen olarak $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ kullanılarak kendi kendine bir araya getirilmiştir. Hibrit nanoçiçeklerin karakterizasyonu FT-IR, XRD ve XPS spektroskopisi ile yapmışlardır. Enzimli hibrit nanoçiçeklerin enzim aktivitesi guaikol substratı kullanılarak ölçülmüştür. Hibrit nanoçiçek yapısındaki enzim serbest enzim SBP aktivitesinin ~%446 kat fazla aktivite göstermiştir. Hibrit nanoçiçekler tekrarlanabilirlik ve tekrar kullanılabilirlik açısından ilk aktivitesinin çoğunu korumuştur. Bu çalışma ile hibrit nanoçiçeklerinin sentezinin etkili bir enzim saflaştırma yöntemi olduğunu göstermiştir (Yu *et al.*, 2015).

Bu çalışma, organik bileşenler olarak glikoz oksidaz (GOx) ve yaban turpu peroksidazı (HRP) ve inorganik bileşen olarak $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ kullanılarak, çoklu enzimle birlikte gömülü organik-inorganik hibrit nanoçiçeklerin sentezi için kolay bir yöntem bildirmişlerdir. Sentezlenen nanoçiçekler, iki enzimli bir kademeli reaksiyonun tek adımında kombinasyonunu mümkün kılmıştır; burada, nanoçiçeklerin GOx bileşeni, H_2O_2 oluşturmak için glikozu oksitleyerek, daha sonra kromojenik substratları oksitlemek için nanoçiçek üzerindeki bitişik HRP bileşeni ile reaksiyona girerek görünür bir renk değişikliğine neden olmuştur. İki enzimli hibrit nanoçiçekleri H_2O_2 'nin difüzyonunu azaltarak glikoz saptama hassasiyetini artırmıştır. Bu nedenle, elde edilen çoklu enzimle birlikte gömülü organik-inorganik hibrit nanoçiçekler, glikozun saptanması için son derece hassas kolorimetrik sensörler olarak kullanılabileceğini ifade etmişlerdir. Özellikle, bu çalışma, çok adımlı kademeli enzimatik reaksiyonların eşzamanlı katalizi için multi enzimli gömülü nanomalzemelerin sentezi için çok kolay bir yol sunmuştur (Sun *et al.*, 2014).

Enzimlerin immobilizasyonu için protein-inorganik hibrit nanoçiçeklerin kullanımı, yüksek enzimatik aktivite ve stabiliteyi muhafaza etme yetenekleri nedeniyle önemli ölçüde ilgi görmüştür. Burada, son derece sağlam enzim-inorganik hibrit nanoçiçekleri sentezlemek için basit ama etkili bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem hibrit nanoçiçeklerde hapsolmuş enzim moleküllerinin glutaraldehit (GA) ile işlenerek daha fazla çapraz bağlanmasına dayanmaktadır. *Candida rugosa*'dan elde edilen lipazı 3 günlük inkübasyon sırasında bakır fosfatlı bir model enzim olarak kullanarak ve ardından GA muamelesi olmaksızın geleneksel olarak sentezlenen nanoçiçekleri yalnızca 1 saat süreyle ek GA işlemi uygulayanmıştır. Çiçeğe benzer morfolojiye ve hidrolitik aktiviteye (serbest enzimle karşılaştırıldığında yaklaşık %95) sahip GA ile işlenmiş lipaz nanoçiçekleri başarıyla sentezleyebilmişlerdir. Geleneksel lipaz nanoçiçekleri dördüncü kez kullanımında aktivitesinin ~%90'ını kaybederken glutaraldehit ile muamele edilen nanoçiçekler 4 kullanımdan sonra ilk aktivitesinin %70'in üstünde korumuştur. Buna çiçeğe benzer morfolojilerinin verimli bir şekilde korunması da eşlik etmiştir (Lee *et al.*, 2017).

Metal iyonları ve laktoperoksidaz enzimi (LPO) ile hibrit nanoçiçeklerinin yeşil bir yaklaşım kullanarak farklı deneysel koşullarda oluşum, aktivite ve stabilitesini çalışmışlardır. Sığır sütünden saflaştırılan LPO enziminden ve bakır iyonlarından (Cu^{2+}) oluşan HNF'ler PBS'de (pH 7,4) iki farklı sıcaklıkta (+4°C ve 20 °C) sentezlemişlerdir. LPO-bakır fosfat HNF'lerin aktivitesi ve stabilitesi üzerine deneysel koşullar, pH ve depolama sıcaklıklarının etkileri, hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında substrat olarak gualikol kullanılarak değerlendirilmiştir. LPO-bakır fosfat HNF ve serbest LPO için optimum pH'lar sırasıyla pH 8

ve pH 6 olarak belirlenmiştir. LPO-bakır fosfat HNF'ların, her pH'ta serbest LPO'dan daha yüksek aktiviteye sahip olduğunu ifade etmişlerdir. LPO-bakır fosfat HNF'nin pH 6 ve pH 8'deki aktiviteleri sırasıyla 70,48 EU/mg, 107,23 EU/mg olarak hesaplanırken, serbest LPO sırasıyla 45,78 EU/mg ve 30,12 EU/mg olarak hesaplanmıştır. Serbest LPO ile karşılaştırıldığında, LPO-bakır fosfat HNF'ler, sırasıyla pH 6 ve pH 8'de aktivitelerde ~%160 ve ~%360 artış göstermiştir. Ek olarak, LPO-bakır fosfat HNF'ler altı döngüden sonra mükemmel bir yeniden kullanılabilirlik sergilemiştir. Son olarak, LPO-bakır fosfat HNF'lerin dopamin ve epinefrinin tespiti için bir nanosensör olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir (Altınkaynak *et al.*, 2016).

Biyomimetik hibrit malzemelerin anlaşılması ve kontrol edilmesi, biyo-nanoteknoloji, malzeme kimyası ve kolloid bilimi alanlarında temel hedeflerdir. İnorganik-organik hibrit nanoçiçeklerin hazırlanmasında enzim, DNA, RNA ve proteinler gibi biyomateryaller kullanılmıştır. Bu perspektiften, sığır serum albümini (BSA) ve kobalt fosfat kullanarak protein ve metal hibrit çiçek benzeri yapıyı sentezlemek için basit bir yaklaşım ve ilgili oluşum mekanizması üzerine çalışmalarının sonuçlarını sunmuşlardır. Zamana bağlı büyüme aşaması ve oluşum mekanizması elektron mikroskopları ve spektroskopik tekniklerle analiz edilmiştir. Bu çalışmada açıklanan hibrit nanoçiçeklerin hazırlanmasına yönelik proteine yükleme yöntemi, biyosensörler, biyoanalitik cihazlar ve endüstriyel biyokatalizör alanlarında olası uygulamalarla diğer biyo-metal hibrit malzemeleri imal etmek için kullanılabileceğini ifade etmişlerdir (Him *et al.*, 2016).

Organik-inorganik bir hibrit glukoamilaz nanoçiçek basit, kolay ve yüksek verimli bir yöntemle tek kapta hazırlanmıştır. Enzimle hazırlanan hibrit nanoçiçek yapılarının oluşum mekanizması, deneysel değerleri (pH, konsantrasyon, sıcaklık) çalışılmıştır. Kendi kendine oluşan hibrit glukoamilaz nanoçiçekler sulu bakır sülfat çözeltisi (200 mM) ile glikoamilaz (1 mg/mL) içeren PBS (pH 7,5, 5 mM) ile 24 saat oda sıcaklığında karıştırılarak sentezlenmiştir. Hazırlanan nanoçiçeklerin karakterizasyonu FT-IR, SEM ve XRD spektroskopisi ile kontrol edilmiştir. Hibrit nanoçiçekler serbest biçime göre yarı ömür (50-70°C aralığında) açısından %204 gelişmiş aktivite geri kazanımı ve termal stabilitede iki kat gelişme göstermiştir. Hibrit glukoamilaz nanoçiçekler mükemmel dayanıklılıklarını gösteren ardışık sekiz döngüden sonra aktivitesinin %70'ini korumuştur. Ayrıca hazırlanan nanoçiçekler 25 gün depolama ile aktivitesinin %91'ini korumuştur. Hibrit nanoçiçekler hazırlandıktan sonra glukoamilaz yapısında meydana gelen konformasyonel değişimler FT-IR spektroskopisi araçlarıyla değerlendirilmiştir (Nadar *et al.*, 2016).

Somturk ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada yaban turpu peroksidaz (HRP) enzimi ve bakır iyonlarından (Cu^{2+}) oluşan inorganik hibrit nanoçiçeğin (hNF) hazırlanma yöntemini ve stabilitesini çalışmışlardır. Bakır (Cu^{2+}) iyonları, klorür iyonları (Cl^-) ve HRP enzimi konsantrasyonlarının, tampon çözeltisinin pH'sının (fosfat tamponu) ve reaksiyonun sıcaklığının bir fonksiyonu olarak hNF'lerin morfolojisini incelemişler. hNF'lerin katalitik aktivitesi ve stabilitesinde morfolojinin etkisi, gualikol (2-metoksifenol) 'un hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında renkli 3,3-dimetoksi-4,4-difenokinona oksidasyonu ile değerlendirmişlerdir. Sentezlenen hNF'lerin arttırılmış aktivitesi (+4 °C'de 10 mM PBS'de (pH 7,4) 0,02 mg mL⁻¹ HRP'den) 17595 U mg⁻¹ olarak hesaplanmış ve PBS'de serbest HRP'den ~%300 daha yüksek olduğu görülmüştür. +4 °C ve oda sıcaklığında muhafaza edilen hibrit nanoçiçek yapıları 30 gün sonra başlangıç aktivitelerinin %96 ve %80'ini korumuşlardır. Sonuç olarak hibrit nanoçiçek yapılarının sensör alanında dopamin tespit analizi için kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

Katalitik aktiviteyi ve stabiliteyi arttırmak için enzim immobilizasyonunda katlanarak artan sayıda malzeme yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Burada, üreaz enzimi ve bakır iyonlarından (Cu^{2+}) oluşan hibrit nanoçiçek (HNF) olarak adlandırılan çiçek şekilli hibrit nanomalzemeleri sentezlemesini ve HNF'nin hem aktivitesi hem de stabilitesindeki artışın mekanik bir açıklamasını rapor etmişlerdir. Deneysel faktörlerin HNF'nin morfolojisini nasıl etkilediğini göstermişlerdir. HNF (0,02 mg mL⁻¹ üreazdan 10 mM PBS (pH 7,4) içinde +4°C'de sentezlenmiştir)'nin, serbest üreaza kıyasla sırasıyla +4 °C ve oda sıcaklığında depolandığında ~%2000 ve ~%4000 ile en yüksek katalitik aktiviteyi sergilediğini kanıtlamışlardır. En yüksek stabilite, bu HNF ile +4°C'de ve oda sıcaklığında 30 günlük depolama içinde başlangıç aktivitesinin sırasıyla %96,3 ve %90,28'ini, muhafaza ederek elde edilmiştir. Bu önemli ölçüde arttırılmış aktivite, yüksek yüzey alanına, nano ölçekte yakalanmış üreaza ve HNF'nin uygun üreaz konformasyonuna atfedilmiştir. HNF'nin olağanüstü katalitik aktivitesi ve stabilite özelliklerinden, biyotıp ve kimya alanlarında kullanmak için yararlanılabileceğini ifade etmişlerdir (Somtürk *et al.*, 2016).

Bu çalışmada ilk kez, *Camellia sinensis* L. (çay bitkisi) özlerinden "nanoçiçek" (Nfs) adı verilen yeni bir organik-inorganik nanobio-antimikrobiyal ajan ve ana bileşenleri üretilmiş ve Nfs'nin antimikrobiyal aktivitesindeki artış açıklanmıştır. Yeşil çay (GT) ekstresi (etanol ve suda hazırlanmış) ve ana bileşenleri (kafein, katekin) Nfs oluşumunda organik bileşenler olarak yer alırken, bakır (II) iyonları (Cu^{2+}) inorganik bileşen olmuştur. Nanoçiçek yapılarının karakterizasyonu SEM, FT-IR ve EDX spektroskopisi kullanılarak incelenmiştir. FT-IR spektroskopisi ile yapılan yapısal inceleme sonucunda nanoçiçeklerdeki Cu-O ve Cu-N

bağlarının olması nanoçiçek yapılarının oluştuğunu göstermiştir. Serbest yeşil çay ekstraktlarının, kafein (cf), kateşin (ct) ve nanoçiçeklerin *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) ve *Candida albicans*'a (ATCC 90028) karşı antimikrobiyal aktiviteleri çalışılmıştır. Nfs'nin Fenton benzeri reaksiyon mekanizmasına bağlı olarak peroksidoza benzeşme aktivitesi, H₂O₂ varlığında gualikole karşı ölçülmüştür. Serbest yeşil çay ekstraktlarının toplam fenol içeriği Folin Ciocalteu ile hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar nanoçiçeklerin kullanımının bilimsel ve teknik çalışmalarda umut vaat ettiğini ifade etmişlerdir (Baldemir *et al.*, 2017).

Katalitik performansı artırmak için enzim immobilizasyonunda platformlar olarak artan sayıda malzeme yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, enzimlerin çoğunun aktivitesi immobilizasyondan sonra azalmıştır. Burada, arayüz aktivasyonuna ve kendiliğinden birleşmeye dayalı rasyonel tasarıma sahip bir yüzey aktif madde ile aktive edilmiş lipaz-inorganik çiçeğe benzer hibrit nanomateryaller geliştirmişlerdir. Elde edilen yüzey aktif cismi ile aktive edilmiş lipaz-inorganik hibrit nanoçiçek (aktive hNF-lipaz), doğal lipaz ve geleneksel lipaz-inorganik hibrit nanoçiçekten (hNF lipaz) %460 ve %200 daha yüksek aktivite sergilemiştir. Ayrıca, aktive edilmiş hNF-lipazı, geçirgenliği ve mekanik özellikleri nedeniyle iyi bir yeniden kullanılabilirlik sergilemiş ve mükemmel uzun süreli stabiliteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu üstün enzim etkinliği hem yüzey aktif maddelerinin allosterik etkisine hemde nanoçiçeklerin hiyerarşik yapısından kaynaklandığını ifade etmişlerdir. Bu çalışmadaki nanobiokatalitik sistem tıp alanında sensör dizaynında çok önemli çalışmalar vaat edebileceğini ifade etmişlerdir (Cui *et al* 2016).

MATERYAL ve METOT

Materyal

Mikroorganizmaların izolasyon kaynakları

Bu çalışmada üç farklı mikroorganizma kullanılmıştır.

Kullanılan mikroorganizmalardan ilkinin izolasyonu için Tebriz/İran'dan getirilen termal su kullanılmıştır.

Mikroorganizmalardan ikincisi Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden Prof. Dr. Ahmet Adıgüzel hocamızdan temin edilmiştir.

Diğer mikroorganizma ise Erciyes Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünden Prof. Dr. Zülal KESMEN hocamızdan temin edilmiştir.

Kullanılan kimyasallar

Pektin, n-bütanol, CaCl_2 , Sodyum asetat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$), Sodyum karbonat (Na_2CO_3), Sodyum Fosfat (Na_3PO_4), Tiyobarbütirik asit, Sodyum hidroksit (NaOH), Hidroklorik asit (HCl), Coomassie Blue R250 ($\text{C}_{45}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{NaO}_7\text{S}_2$), Glisin ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$), Tripolifosfat (TPP), Amonyum sülfat (NH_4) $_2\text{SO}_4$, Kitosan($\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_9$). Tüm kimyasallar analitik saflıkta kullanılmıştır. Çözeltiler hazırlanırken ve deneysel aşamalarda ultra saf su kullanılmıştır.

Kullanılan cihazlar

Nanodrop Epoch	UV/VIS Spectrofotometer
Hassas Terazı	(KERN ABS)
Buzdolabı	(Bosch KAN62V70NE-Ever Med Medical refrigeration)
Soğutmalı santrifüj	(JP selecta cetrofriger-BL II)
Derin dondurucu	(Bosch)
Santrifüj	(JP Selecta Cenrtrofriger-BL)
Distile su cihazı	(GFL 2004)
Elektroforez	(BioRad)
Soğutmalı santrifüj	(Beckmann)
Etüv	(JP Selecta Cod:2001248)
Manyetik karıştırıcı	(Wise Stir MSH-20D, Stuart SB162-Are)
Otoklav	(JP Selecta)

pH Metre	(Crison Basic 20)
Vorteks	(Heidolp)
Su Banyosu	(JP Selecta)
UV-VIS Spektrofotometre	(Thermo scientific Genesys 10S UV-VIS)

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Pektin liyaz enziminin karakterizasyon çalışmasında optimum pH değerini belirlemek için farklı tampon çözeltileri kullanıldı. Sodyum asetat tamponu pH (3.0-5.0) aralığındaki değerler için, sodyum fosfat tamponu pH (6.0-8.0) aralığındaki değerler için ve glisin tamponu pH (9.0-11.0) aralığındaki değerler için kullanıldı.

Tampon çözeltilerinin hazırlanması

✓ Sodyum asetat tamponu

Pektin liyaz enziminin pH 3-5 aralığındaki aktivitesini araştırmak için kullanıldı. 5 mM asetat tamponunun hazırlanması için 0,041 g sodyum asetat (NaCH_3COO) tartılıp ve 80 mL saf suda çözülerek pH 3-5 değer aralığı için 0,1 M'lık NaOH ve/veya HCl çözeltisi ile ayarlandı. Belirlenen pH değerlerinde distile su ile son hacim 100 mL olarak tamamlandı.

✓ Sodyum fosfat tamponu

Pektin liyaz enziminin pH 6-8 aralığındaki aktivitesini araştırmak için kullanıldı. 5 mM sodyum fosfat tamponunun hazırlanması için 0,071 g sodyum fosfat tartılarak 80 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı (6.0-8.0) ayarlamak için 0,1 M'lık NaOH ve/veya HCl çözeltisi kullanıldı. Belirlenen pH değerlerinde distile su ile son hacim 100 mL olarak tamamlandı.

✓ Glisin tamponu

Pektin liyaz enziminin pH 9-11 aralığındaki aktivitesini araştırmak için kullanıldı. 5 mM glisin tamponunun hazırlanması için 0,0375 g glisin tartılarak 80 mL distile edilmiş suda çözüldü daha sonra pH değerlerinin (pH 9.0-11.0) ayarlanması için 0,1 M'lık NaOH ve/veya HCl çözeltiler kullanıldı. Belirlenen pH değerlerinde distile su ile son hacim 100 mL olarak tamamlandı.

Substrat çözeltilerinin hazırlanması

✓ Pektin

%93'lük pektinden 0,15 g olarak tartıldıktan sonra 0,05 M pH 8 olan 10 mL fosfat tamponunda çözülerek 0,014 g/mL konsantrasyonunda pektin substratı hazırlandı.

✓ **Locust beam gum**

Locust beam gum 0,15 g olarak tartıldıktan sonra 0,05 M pH 8 olan fosfat tamponundan 10 ml ilave edilerek 0,015 g/mL locust beam gum substratı hazırlandı.

✓ **Kitin**

Kitin 0,15 g olarak tartıldıktan sonra 0,05 M pH 8 olan fosfat tamponundan 10 ml ilave edilerek 0,015 g/mL kitin substratı hazırlandı.

Coomassie brilliant blue G-250 çözeltisinin protein tayini için hazırlanması

Coomassie brilliant blue G-250 çözeltisi protein tayini için 0,1 g tartılarak %50 mL 95'lik etanol çözeltisinin içine katılarak çözüldü. Coomassie brilliant blue G-250 çözüldükten sonra içerisine 100 mL %95'lik fosforik asit çözeltisi eklenerek son hacim distile edilmiş su ile 1 L olacak şekilde tamamlandı.

Katı kültür fermentasyon çözeltileri

❖ **Besi solüsyonu**

Saflaştırılan bakterilerden pektin liyaz üretiminde besiyeri olarak kepek kullanıldı. Besiyeri ortamına eklediğimiz besi solüsyonu içeriği;

✓ %0,14 (NH₄)₂SO₄,

✓ %0,2 KH₂PO₄

✓ %0,02 MgSO₄

tartılarak distile su ile hazırlandı ve pH 7 olarak ayarlandı.

❖ **Besiyeri**

Katı kültür fermentasyonunda besiyeri için; 5 g kepek %1 oranında pektin (ED %9,3) 250 mL bir erlen içerisinde karıştırıldı. Daha sonra üzerine 10 mL besi solüsyonu eklendi.

Enzim aktivitesinde kullanılan çözeltiler

Pektin liyaz aktivite çalışması

Çözeltiler	Hazırlanışı
% 1,4 pektin çözeltisi	%93'lük pektinden 1,5 g alınarak 0,05 M 100 ml pH 8 olan fosfat tamponuna eklenerek hazırlandı.
0,05 M pH 8 fosfat tamponu	7,801 g sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) tartılarak üzerine 800-900 mL saf su eklenerek çözülür ve çözeltinin pH değeri 8'e ayarlanarak son çözelti hacmi 1000 mL ye tamamlanır.
1 N NaOH	1 N NaOH çözeltisinin hazırlanması için 4 g NaOH 90 mL distile su ile çözülerek çözelti hacmi 100 ml olacak şekilde tamamlandı.
1 N HCl	1 N HCl için; 13,4 mL derişik (%36,5 lik ve yoğunluğu 1,12 g/mL) HCl asit çözeltisinden alınarak son çözelti hacmi distillenmiş su ile 150 mL'ye seyreltili.
0,04 M tiyobarbütirik asit çözeltisi	0,23 g tiyobarbütirik asit 40 ml distile su bulunan deney tüpü içerisine eklenerek tiyobarbütirik asit çözeltisi hazırlandı.

Elektroforez çözeltilerinin hazırlanması

Çözeltiler	Hazırlanışı
Yürütme tampon çözeltisi	1,5 gr trizma, 7,2 gr glisin tartılarak ve üzerine 5 mL (%10) SDS eklenerek son hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.
Numune tamponu	3 mL %1'lik SDS, 0,65 mL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 1 mL %100 gliserin, 1 mL %0,1 brom timol mavisi ilave edilerek hazırlandı. Hazırlanan numune tamponundan 1 mL alınarak üzerine 50 μL β -merkaptoetanol ilave edildi.
Boyama çözeltisi	0,1 g Coomassie Blue R250, 50 mL metanol, 10 mL asetik asit ve 40 mL saf su karıştırılarak hazırlandı.
Akrilamid-bisakrilamid çözeltisi	15 g akrilamid, 0,4 g bis-akrilamid 30 mL distile su ile karıştırılarak hazırlandı.
%10 SDS çözeltisi	10 g SDS 90 mL distile suda karıştırılarak hazırlandı.
Ayırma jeli	13,2 mL %30'luk Akrilamid, 15 mL 1 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,6 mL %1 SDS 9,4 mL distile su, 7 damla TEMED ve 0,15 mL amonyum persülfat karıştırılarak hazırlandı.
Yığma jeli	1 mL akrilamid, 1,24 mL Tris-HCl (pH 6,8) 0,1 mL SDS, 7,8 mL distile su, 5 damla TEMED, 30 μL amonyum persülfat karıştırılarak hazırlandı.
Jel sabitleme çözeltisi	%50 izopropanol, %10 TCA ve %40 distile su içeren karışım hazırlandı.
Jel yıkama sıvısı	%60 distile su, %10 asetik asit ve %30 metanolden oluşan karışım hazırlandı.

Metot

Mikroorganizmaların izolasyonu

Bu tez çalışmasında kullandığımız mikroorganizmalar farklı kaynaklardan temin edildi. Mikroorganizmalardan biri İran termal kaynaklarından izole edildi. Termal kaynak suyu ile Nutrient Broth besiyeri hazırlanıp çalkalamalı inkübatörde 25°C’de 48 saat inkübe edildi. Fizyolojik serum (%0,85-0,90’luk NaCl) ile seri dilüsyon hazırlanarak bakteri analizlerinde kullanıldı. Hazırlanan her bir dilüsyondan Nutrient agar besiyerine yayma şeklinde ekim yapıldı. 25°C’de etüvde 48 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra besiyerlerinde gelişen bakterilerden Nutrient Agara 3 faz çizilerek saflaştırma işlemi yapıldı. Bu agara çizme işlemine tek koloniler oluşana kadar devam edildi. Elde edilen tek kolonileri içerisinde %20 gliserol bulunan Nutrient Broth besiyerine aktararak -80°C’de saklandı.

Gram reaksiyonlarının belirlenmesi

İzole edip saflaştırdığımız bakterilerin 18-24 saatlik kültürleri ile gram boyama reaksiyonları yapıldı. Bir lam tabakasının üzerine bir damla steril su damlatılarak genç kültürden bir öze ile alındı ve damlatılan suda mikroorganizma homojen olacak şekilde yayıldı. Ardından lam oda sıcaklığında bekletilerek kurutuldu ve ardından bek alevinde tekrar kurutma işlemi yapıldı. İkinci basamak olarak boyama işlemine geçildi. Lamin üzerine kristal viyoleto boyası damlatılarak 1-2 dakika bekletildi. Fazla kristal viyoleto uzaklaştırılması için lügol çözeltisi ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra yeniden lügol çözeltisi damlatılarak 2 dakika bekletildi ve distile su ile yıkandı. Lam üzerine %95’lik etanol çözeltisi damlatılarak 10 saniye bekletildi. Cam lam distile su ile yıkanarak sulu fuksin içinde yaklaşık 20 saniye bekletildi. Sulu fuksin içinde bekletilen lamlar distile su ile yıkanarak kurutuldu. Bu işlemlerden sonra lamlar immersiyon merceğinde mikroskopta incelendi. Kristal viyoleto çözeltisini içinde tutabilen mor renkli görünen bakteriler gram pozitif (+); hücre dışına bırakan pembe-kırmızı görünen bakteriler gram negatif (-) olarak değerlendirildi.

Katalaz reaksiyonlarının belirlenmesi

Temiz bir lam üzerine öze ile bakteri kültürü yayıldı. Yayılan kültür üzerine baktident katalaz çözeltisi damla damla eklenerek hava kabarcığı gözlemlenenler katalaz (+) olarak kaydedildi.

Mikroorganizmaların tanımlanması

Erzurum MYO, Gıda İşleme Bölümü'nde izolasyonları yapılan mikroorganizmaların saf kültürleri tanımlanması Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bölümü'nde gerçekleştirildi.

Pektin liyaz enziminin üretimi ve homojenat hazırlanması

Pektin liyaz (PL) enziminin üretimi için buğday kepeği katı hal fermentasyon tekniği kullanılarak farklı kaynaklardan izole edilen mikroorganizmalar kullanıldı. 250 mL kapasiteli erlenmayer şişelerine %0,1 oranında pektin ile karıştırılmış 5 g buğday kepeği üzerine 10 mL besleyici solüsyon eklenerek PL üretimi için besi yerleri hazırlandı. Hazırlanan besi yerleri sterilizasyon işlemi için 121°C'de 20 dakika tutularak otoklavlandı. Hazırlanan besi yerlerine mikroorganizmalar steril kabinde 2 ml eşit şekilde hazırlanmış spor süspansiyonu ile aşılandı ve 5 gün 34°C'de inkübe edildi.

İnkübasyondan sonra besi yerlerine içerisinde %0,9 NaCl çözeltisinden 60 mL eklenerek 1 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. 10000 rpm'de santrifüj işlemi yapılarak süpernatant ve çökelek olarak ayrıştırıldı. Süpernatant kısımda pektin liyaz aktivitesi kontrolü ve protein tayini yapıldı. Daha sonra üçlü faz ayrımı metoduna göre saflaştırma işlemi yapıldı (Taragano and Pilosof 1999).

Pektin liyaz aktivite tayini

PL enziminin aktivite tayininde doymamış üronik esterin tiyobarbütirik asit ile 550 nm'de UV absorpsiyonuna renkli türe dönüştürülmesi esasına dayanan bir yöntem kullanıldı (Nedjma *et al.* 2001).

PL enziminin aktivite tayininde;

- ❖ 250 µL enzim çözeltisi 250 µL substrat çözeltisi ile 10 dakika uygun sıcaklıkta su banyosunda inkübe edildi.
- ❖ Su banyosundan çıkarıldıktan sonra 50 µL 1 N NaOH ilave edilerek 80°C'de 5 dakika tekrar inkübe edildi.
- ❖ İnkübasyon işleminden sonra numuneler soğutuldu ve üzerine 600 µL 1 N HCl ve 500 µL 0,04 tiyobarbütirik asit ilave edildi. 80°C'de 5 dakika süre ile tekrar inkübe edildi.
- ❖ 3000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenerek üstteki sıvı kısmın 550 nm'de köre karşı PL enzim aktivite tayini yapıldı. Kör çözeltisi olarak tampon çözelti kullanıldı (Nedjma *et al.*, 2001).

Bradford metoduna göre protein tayini

Bradford protein tayin metodu bir numune içerisindeki protein miktarının belirlenmesinde kullanılan kantitatif bir analiz yöntemidir. Coomassie Brilliant Blue G-250 negatif yükü proteinlerdeki pozitif yüke bağlanır. Oluşan kompleks 595 nm’de en yüksek absorbanı göstermektedir. Bu yöntem kısa süre içerisinde gerçekleşmesi, protein boya kompleks yapısının çözeltisinde uzun süre bulunması ve bozucu faktörlerin az olması avantajlarındandır. 1-100 µg aralığında hassasiyeti vardır (Bradford, 1976).

Protein miktarı tayininde saflaştırma işleminin tüm basamaklarında çökeleklerden ve saflaştırılmamış ekstraktan 100 µL alınarak, üzerlerine 5 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Kör olarak enzim çözeltisi yerine distile su koyuldu. 595 nm’de köre karşı absorban değeri okundu (Bradford, 1976).

Pektin liyaz enziminin üçlü faz ayırma tekniğine göre saflaştırılması

Ekstraselüler PL enzimi üçlü faz ayırma (ÜFA) metoduna göre izole edilip tanımladığımız mikroorganizmalardan saflaştırıldı (Gagaoua *et al.*, 2016). İlk olarak t-bütanol oranı belirlendi. 10 mL homojenat örneği bulunan 4 behere 4 g (NH₄)₂SO₄ ve 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5 ve 1,0:2,0 oranlarında t-bütanol eklendi. 30 dakika süre ile buz banyosunda manyetik karıştırıcı kullanılarak 200 rpm’de karıştırıldı. Karıştırma işleminden sonra 10000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüj işleminden sonra organik faz (üstte) çökelek fazı (ortada) ve su fazı (altta) olmak üzere 3 faz oluştu. Çökelek fazı uygun pH değerinde fosfat tamponu kullanılarak çözündürüldü. 3 fazda 0,05M fosfat tamponuna karşı buz banyosunda 3 saat diyaliz edildi. Daha sonra aktivite ve protein tayini yapıldı. Çökelek fazında protein ve aktivite tayini organik faz ve sulu faza göre daha yüksekti. Bu nedenle çökelek fazı ele alınarak optimizasyon işlemleri yapıldı (Rawdkuen *et al.*, 2010).

İkinci basamakta ise amonyum sülfat optimizasyonu için çalışıldı. 10 mL pektin liyaz homojenatı ve belirlenen optimum miktarda n-bütanol 4 behere eklenerek %20, %40, %60 ve %80 oranlarında amonyum sülfat ilave edildi ve buz banyosunda 30 dakika boyunca 200 rpm’de manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra 10 dakika 6000 rpm’de santrifüjlendi. Çökelek fazı uygun pH değerindeki fosfat tamponu kullanılarak çözündürüldü. 3 fazda 0,05M fosfat tamponuna karşı buz banyosunda 3 saat diyaliz edildi. Daha sonra aktivite ve protein tayini yapıldı. Pektin liyaz aktivitesi yüksek olan fazda optimizasyon işlemleri yapıldı (Rawdkuen, 2010).

Pektin liyaz enziminin SDS-PAGE yöntemi ile molekül ağırlığının belirlenmesi

Mikroorganizmalardan saflaştırdığımız PL enziminin molekül ağırlığını belirlemek için SDS-PAGE poliakrilamid jel elektroforezi yöntemi kullanıldı.

Pektin liyaz enziminin saflaştırılmasından sonra Laemmli (1970) metoduna göre SDS-PAGE elektroforez tekniği ile enzime ait moleküler ağırlığı ve saflık derecesi kontrol edildi. Enzim numune tamponunda 95°C’de 5 dakika inkübe edildi. Denatüre edilen proteinler jele yüklendi. Sistem 20 mA akımda güç kaynağına bağlanarak yaklaşık 4 saat boyunca yürütüldü. Yürütme işleminden sonra ayırma jeli boyanarak bantlar tespit edildi.

Pektin liyaz enziminin optimum pH değerinin belirlenmesi

pH optimizasyonunu belirlemek için pH 3-5 aralığında sodyum asetat, pH 6-8 aralığında fosfat ve pH 9-11 aralığında glisin tamponu kullanıldı. Bu tamponlardan her pH değerinde substrat çözeltileri hazırlandı.

Optimum pH değerini belirlemek için her pH değerinde numune ve kör olarak deney tüpleri hazırlandı. 250 µL enzim ve 250 µL substrat olmak üzere enzimli deney tüpü, 250 µL substrat 250 µL aynı pH değerinde tampon kör deney tüpü için hazırlandı. 10 dakika uygun sıcaklıkta inkübasyona tabi tutuldu. Daha sonra PL enzim aktivite tayini yapıldı (Nadaroğlu *et al.*, 2010).

Pektin liyaz enziminin stabil pH değerinin belirlenmesi

Mikroorganizmalardan saflaştırdığımız pektin liyaz enziminin stabil pH değerini belirlemek için pH 3-11 aralığında enzim çözeltisi tampon çözeltisi içerisinde 1 hafta boyunca bekletilerek her gün aktivite tayini yapıldı. Hazırlanan numunelerden PL enziminin aktivite tayininde 250 µL çalışılacak pH değerinde enzim ve 250 µL substrat kullanıldı. Daha sonra PL enzim aktivite tayini yapıldı.

Pektin liyaz enziminin optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi

Mikroorganizmalardan saflaştırdığımız pektin liyaz enziminin optimum sıcaklık değerini belirlemek için 10-90 °C aralığındaki sıcaklık değerlerinde çalışıldı. 250 µL substrat çözeltisine 250 µL enzim eklenerek 10 dakika uygun sıcaklıkta inkübe edildi. Kör olarak enzim yerine tampon çözeltisi eklendi. Daha sonra belirlenen aktivite tayini yapıldı (Nadaroğlu *et al.*, 2010).

Pektin liyaz enziminin stabil sıcaklık değerinin belirlenmesi

Pektin liyaz enziminin stabil sıcaklık değerini belirlemek için 10-90 °C sıcaklık aralığında su banyosunda çalışıldı. Her sıcaklık için ayrı ayrı enzim ve kör olmak üzere iki deney tüpü hazırlandı.

Belirlenen sıcaklık değerinde enzim çözeltisi ve kör olarak kullanılan tampon çözeltisi 2 saat boyunca bekletildi ve her 15 dakikada bir 250 µL enzim çözeltisi 250 µL kör olarak kullanılan tampon çözeltisinden alınarak aynı sıcaklıkta aktivite tayini yapıldı (Nadaroglu *et al.* 2010).

Pektin liyaz enziminin metal iyonları etkisinin belirlenmesi

Metal iyonlarının pektin liyaz enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini araştırmak için CaCl₂, FeCl₂, CuCl₂, MgCl₂, HgCl₂ ve ZnCl₂ metal iyonları kullanıldı.

Enzim ve belirlenen metal iyonlarının konsantrasyonları 1 mM ve 5 mM olacak şekilde iki konsantrasyonda çalışıldı. 1 mM ve 5 mM olacak şekilde hazırlanan metal iyonları enzim aktivitesinde substrat çözeltisi ile optimum sıcaklıkta 30 dakika inkübasyona tabi tutuldu. Her aktivite için ayrı kör olarak deney tüpü ve kontrol grubu hazırlandı. Kontrol grubuna metal iyonu yerine distile su ilave edildi. Daha sonra belirlenen aktivite tayini yapıldı.

Pektin liyaz enziminin V_{max} ve K_m değerlerinin belirlenmesi

Mikroorganizmalardan saflaştırdığımız serbest ve hibrit pektin liyaz enziminin maksimum hız (V_{max}) ve hız sabitini (K_m) belirlemek için 2mM pektin, locus beam gum ve kitin substratları kullanıldı. Beş farklı substrat konsantrasyonunda pektin liyaz aktiviteleri ölçüldü ve 1/V'ye karşı 1/S Linewear-Burk grafiği çizildi.

Pektin Liyaz-Ca²⁺ hibrit nanoçiçek yapılarının sentezi

%1'lik asetik asit solüsyonunda 2 mg/mL konsantrasyonunda kitosan çözöldü. 125 mg/mL tripolyphosphate (TPP) çözeltisinden 1,2 mL alınarak 3 mL kitosan çözeltisi ile 10 dakika karıştırıldı. Sonra 4,2 mL 100 mM CaCl₂ çözeltisi eklendi. 10 dakika oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 2,5 mL saflaştırılan pektin liyaz enzimi eklenerek tekrar karıştırıldı. Bir gün oda sıcaklığında bekletildi ve süpernatant kısmında protein tayini yapıldı. Santrifüj işleminde ile çökelek 3 kez yıkama işlemine tabi tutuldu. Daha sonra çökelek 37 °C'de etüvde kurutuldu. Kuruyan hibrit nanoçiçek yapılarının SEM, EDX, FT-IR ve TEM analizleri kullanılarak karakterizasyonu yapıldı (Wang *et al.* 2014). Serbest enzimde yapılan karakterizasyon işlemleri hibrit nanoçiçek yapıları için tekrar yapıldı.

Pektin Liyaz-Ca²⁺ hibrit nanoçiçek yapılarının SEM, EDX, XRD, FT-IR ve TEM karakterizasyonu

Hazırlanan hibrit nanoçiçek yapılarının karakterizasyonu SEM, EDX, TEM, XRD ve FT-IR analizleri kullanılarak yapıldı (Wang *et al.* 2014).

Yeniden kullanılabilirlik alışmaları

Hibrit nanoçiçek pektin liyaz enziminin yeniden kullanılabilirliği optimum pH ve sıcaklık koşullarında gerçekleştirildi. Reaksiyon substrat olarak pektin kullanılarak gerçekleştirildi. Her dngden sonra, hibrit nanoçiçek pektin liyaz reaksiyon ortamından alındı ve tampon ile yıkanarak aktivitesi substrat çözeltisi ile yeniden çalışıldı. Bu işlem art arda 10 kez gerçekleştirildi. Aktivite, her bir dngden sonraki kalıntı aktivitesi açısından, birinci dng için %100 kalıntı aktivite dikkate alınarak belirlendi (Sojitra *et al.*, 2017).

Meyve suyu denemeleri

İzmir yerel marketlerinden temin edilen ilek, dağ ileği, siyah çözüm, nar, portakal, elma ve vişne meyveleri meyve suyu denemelerinde kullanıldı. Meyve suyu çalışmasında kullanılacak meyveler ilk olarak yıkandı ve blendırda homojen bir şekilde parçalandı. Sonra preler 1/1 oranında distile su ile seyreltildi. Seyreltilen prelerden 10’ar gram alınarak 50 mL’lik beherlere koyuldu ve üzerine 2 mL serbest enzim veya hibrit nanoçiçek pektin liyaz eklendi. Kontrol grubu olarak 2 mL distile su ilave edildi. Hazırlanan beherler optimum koşullarda 5 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra preler soğutulularak vakumla szld. Szldkten sonra geriye kalan meyve posaları 105 C’de kurutularak kuru madde tayini yapıldı ve % parçalanma hesaplandı (Soares *et al.* 2001).

$$\% \text{ Parçalanma} = \frac{\text{Enzimli deneme (g)} - \text{Kontrol (g)} \times 100}{\text{Kontrol (g)}}$$

Süzülen meyve sularında 660 nm’de optik dansisite ölçülerek absorbanstaki % azalma hesaplandı.

ARAŞTIRMA BULGULARI

Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

Bu çalışmada kullanılan mikroorganizmalar farklı kaynaklardan temin edildi. Elde edilen mikroorganizmalardan olan *Lactobacillus plantarum*, *Aeribacillus pallidus* ve *Pseudomonas fragi* bakterilerinden ekstraselüler olarak daha fazla pektin liyaz enzimi ürettiği tespit edilip bu çalışma için kullanıldılar.

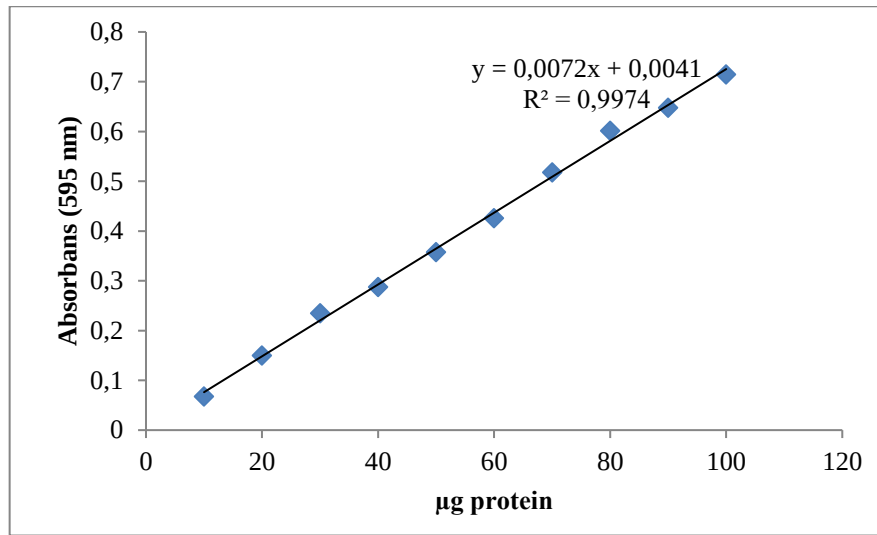
Gram boyama sonucunda *Lactobacillus plantarum* ve *Aeribacillus pallidus* gram pozitif, *Pseudomonas fragi* ise gram negatif olarak bulundu. Katalaz testi sonucunda ise *Aeribacillus pallidus* ve *Pseudomonas fragi* katalaz pozitif, *Lactobacillus plantarum* ise katalaz negatif olarak bulundu (Tablo 4).

Tablo 4. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmaların Gram ve Katalaz Reaksiyonu

Bakteri	Gram Reaksiyonu	Katalaz Reaksiyonu
<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-
<i>Aeribacillus pallidus</i>	+	+
<i>Pseudomonas fragi</i>	-	+

Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

Lactobacillus plantarum, *Aeribacillus pallidus* ve *Pseudomonas fragi* bakterilerinden saflaştırılan pektin liyaz enziminin protein tayini Bradford metodu ile yapıldı ve standart eğri çizildi. Saflaştırılan pektin liyaz enziminin homojenat ve üçlü faz ayırımı metoduna göre saflaştırılan numunelerin protein miktarı standart grafikten faydalanılarak hesaplandı. Sığır serum albümin kullanılarak elde edilen standart grafik Şekil 11’de gösterildi.



Şekil 11. Bradford yöntemi ile protein tayini için kullanılan standart grafik

***L. plantarum*, *A. pallidus* ve *P. fragi*'den Üretilen ve Üçlü Faz Ayırma Metoduna Göre Saflaştırılan Pektin Liyaz (PL) Enzim Sonuçları**

Lactobacillus plantarum, *Aeribacillus pallidus* ve *Pseudomonas fragi* bakterilerinden pektin liyaz enzimi saflaştırması üçlü faz ayırma (ÜFA) metoduna göre yapıldı (Sharma and Gupta 2001).

L. plantarum'dan üretilip ÜFA metoduna göre saflaştırdığımız PL enziminin ilk olarak n-bütanol optimizasyonu yapıldı. Elde edilen aktivite sonuçlarına göre 1:0,5 oranında (ekstrakt:n-bütanol) optimum PL enzim aktivite değeri belirlendi (Şekil 12). Belirlenen optimum n-bütanol konsantrasyonunda %20-%80 arasında amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. En yüksek PL aktivite değeri %60 oranında elde edildi (Şekil 13). ÜFA metoduna göre saflaştırılan PL enzimi %81,5 verim ve 74,8 kat olarak saflaştırıldı (Tablo 5).

A. pallidus'dan üretilip ÜFA metoduna göre saflaştırdığımız PL enziminin ilk olarak n-bütanol optimizasyonu yapıldı. Elde edilen aktivite sonuçlarına göre 1:1 oranında (ekstrakt:n-bütanol) optimum PL enzim aktivite değeri belirlendi (Şekil 14). Belirlenen optimum n-bütanol konsantrasyonunda %20-%80 arasında amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. En yüksek PL aktivite değeri %70 oranında elde edildi (Şekil 15). ÜFA metoduna göre saflaştırılan PL enzimi %82 verim ve 158,71 kat olarak saflaştırıldı (Tablo 6).

P. fragi'den üretilip ÜFA metoduna göre saflaştırdığımız PL enziminin ilk olarak n-bütanol optimizasyonu yapıldı. Elde edilen aktivite sonuçlarına göre 1:1 oranında (ekstrakt:n-bütanol) optimum PL enzim aktivite değeri belirlendi (Şekil 17). Belirlenen optimum n-bütanol konsantrasyonunda %20-%80 arasında amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. En yüksek PL aktivite değeri %40 oranında elde edildi (Şekil 18). ÜFA metoduna göre saflaştırılan PL enzimi %78,1 verim ve 63,9 kat olarak saflaştırıldı (Tablo 7).

Tablo 5. *L. plantarum* Bakterisinden ÜFA Metodu İle Saflaştırılan Pektin Liyaz Enzimine Ait Saflaştırma Profili

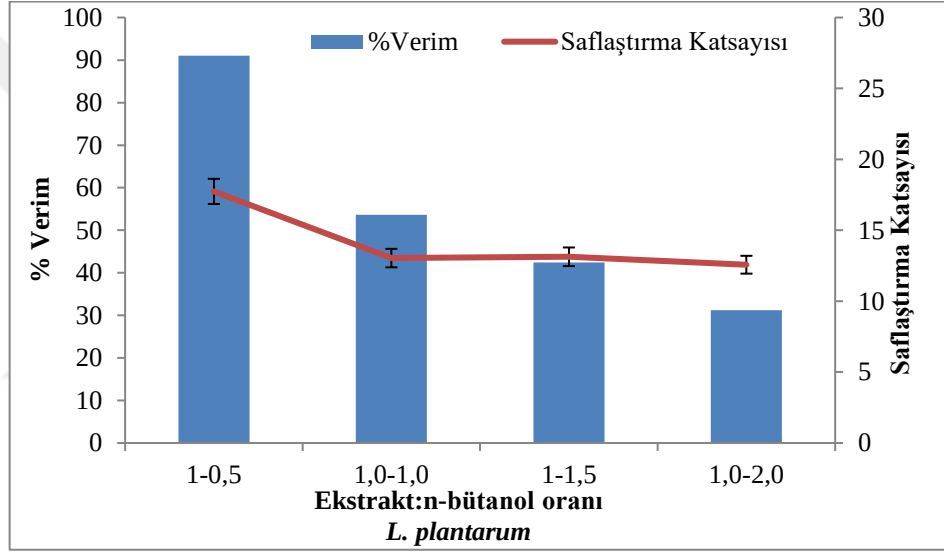
Basamaklar	Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Total Aktivite (EU/mL)	%	Protein (mg protein/mL)	Spesifik Aktivite (EU/mL)	Saflaştırma Katsayısı
Ekstrakt	30	62,24	1867,2	100	1016,09	0,06	-
n-bütanol (1:0,5)	10	169,92	1699,2	91	156,1	1,08	18
Amonyum Sülfat (%60)	10	152,18	1521,8	81,5	33,88	4,49	74,8

Tablo 6. *A. pallidus* Bakterisinden ÜFA Metodu İle Saflaştırılan Pektin Liyaz Enzimine Ait Saflaştırma Profili

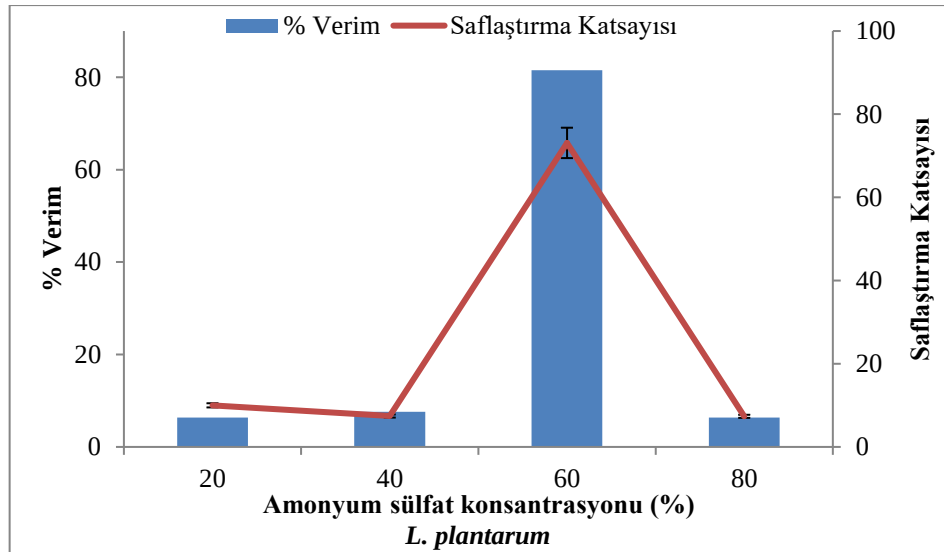
Basamaklar	Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Total Aktivite (EU/mL)	%	Protein (mg protein/mL)	Spesifik Aktivite (EU/mL)	Saflaştırma Katsayısı
Ekstrakt	30	66,77	2003,1	100	953,86	0,07	-
n-bütanol (1:1)	10	186,28	1862,8	93	98,04	1,90	27,14
1.Amonyum Sülfat (%60)	10	174,27	1742,7	87	45,74	3,81	54,43
2.Amonyum Sülfat (%70)	10	164,25	1642,5	82	14,78	11,11	158,71

Tablo 7. *P. fragi* Bakterisinden ÜFA Metodu İle Saflaştırılan Pektin Liyaz Enzimine Ait Saflaştırma Profili

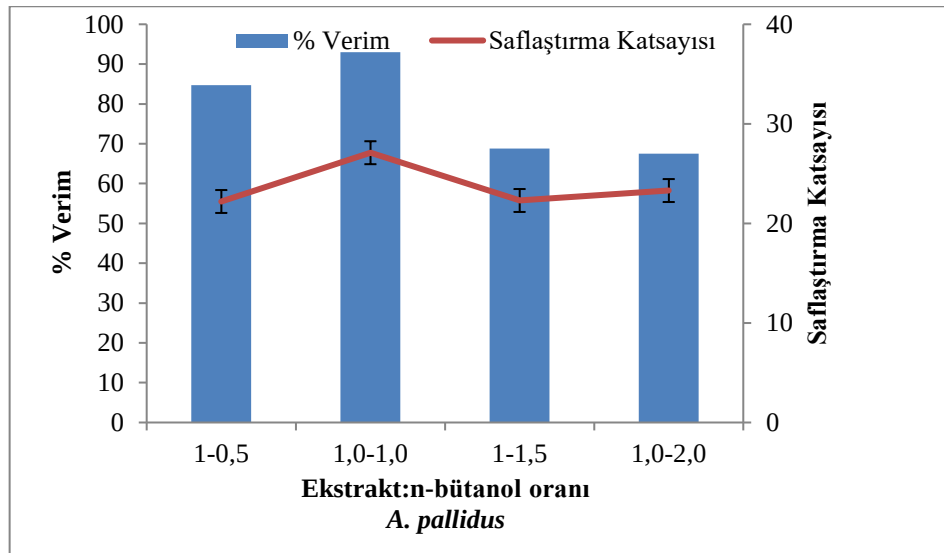
Basamaklar	Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Total Aktivite (EU/mL)	%	Protein (mg protein/mL)	Spesifik Aktivite (EU/mL)	Saflaştırma Katsayısı
Ekstrakt	30	58,85	1765,36	100	300,8	0,19	-
n-bütanol (1:1)	10	146,525	1465,25	83	22,47	6,52	34,32
Amonyum Sülfat (%40)	10	137,874	1378,74	78,1	11,36	12,14	63,9



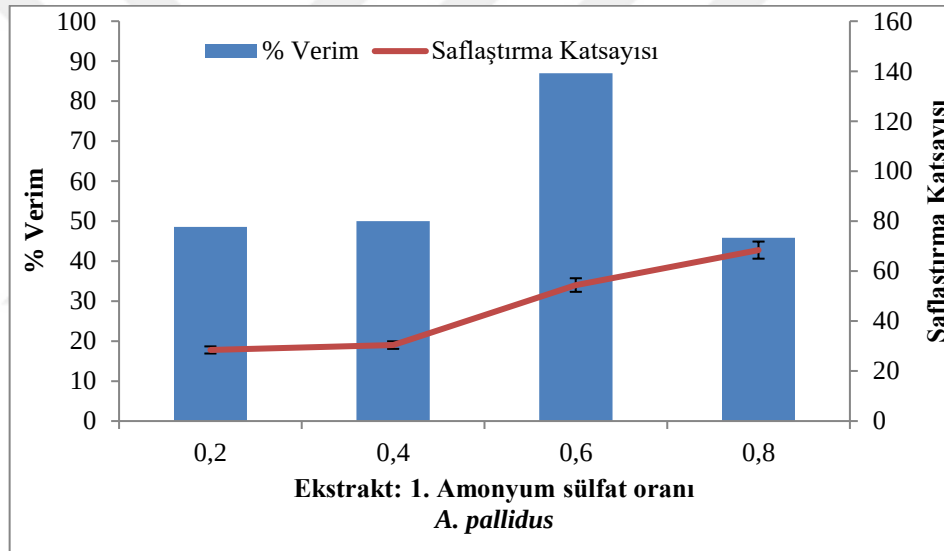
Şekil 12. *L. plantarum* bakterisinden saflaştırılan PL enziminin ekstrakt:n-bütanol oranı



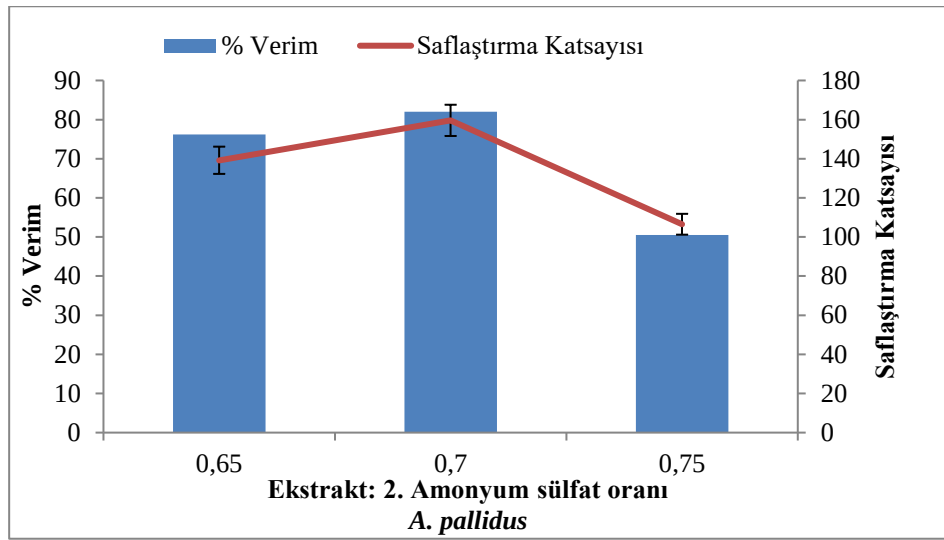
Şekil 13. *L. plantarum* bakterisinden saflaştırılan PL enziminin ekstrakt:amonyum sülfat oranı



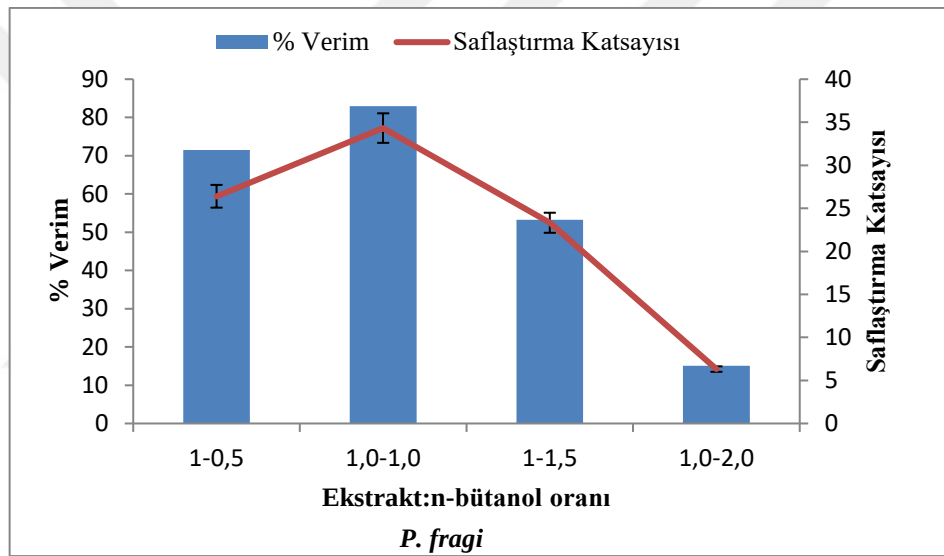
Şekil 14. *A. pallidus* bakterisinden safaştırılan PL enziminin ekstrakt:n-bütanol oranı



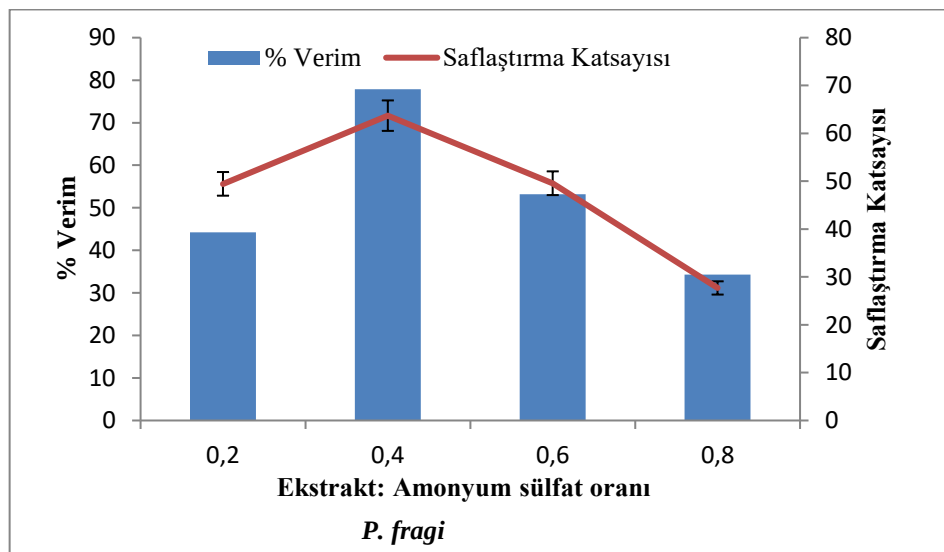
Şekil 15. *A. pallidus* bakterisinden safaştırılan PL enziminin ekstrakt: 1. amonyum sülfat oranı



Şekil 16. *A. pallidus* bakterisinden saflaştırılan PL enziminin ekstrakt: 2. amonyum sülfat oranı



Şekil 17. *P. fragi* bakterisinden saflaştırılan PL enziminin ekstrakt:n-bütanol oranı



Şekil 18. *P. fragi* bakterisinden saflaştırılan PL enziminin ekstrakt:amonyum sülfat oranı

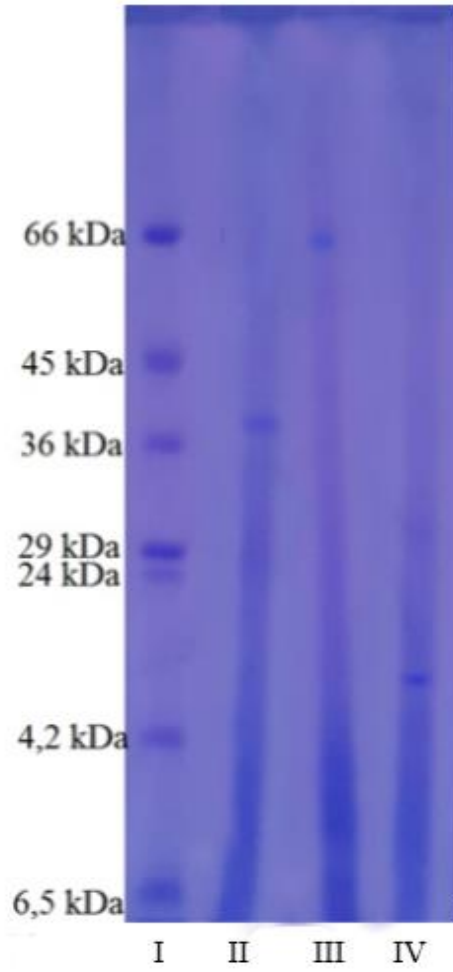
Şekil 12’de *L. plantarum* bakterisinden saflaştırılan pektin liyaz enziminin en yüksek aktivite (169,92 EU/mL) 1:0,5 ekstrakt:n-bütanol oranında belirlendi. Şekil 13’de ise en yüksek aktivite (152,18 EU/mL) %60 amonyum sülfat konsantrasyonunda görüldü. Aktivitenin en düşük olduğu değer ise 1:2 ekstrakt:n-bütanol konsantrasyonunda (58,28 EU/mL) ve %80 amonyum sülfat konsantrasyonunda (11,88 EU/mL) hesaplandı.

Şekil 14’de *A. pallidus* bakterisinden saflaştırılan pektin liyaz enziminin en yüksek aktivite (186,28 EU/mL) 1:1 ekstrakt:n-bütanol oranında belirlendi. Şekil 15 ve Şekil 16’da ise en yüksek aktivite (174,27 EU/mL) %60 amonyum sülfat ve (164,25 EU/mL) %70 amonyumsülfat konsantrasyonunda görüldü. Aktivitenin en düşük olduğu değer ise 1:2 ekstrakt:n-bütanol konsantrasyonunda (135,2 EU/mL) ve %80 amonyum sülfat konsantrasyonunda (85,2 EU/mL) hesaplandı.

Şekil 17’de *P. fragi* bakterisinden saflaştırılan pektin liyaz enziminin en yüksek aktivite (146,53 EU/mL) 1:1 ekstrakt:n-bütanol oranında belirlendi. Şekil 18’de ise en yüksek aktivite (137,5 EU/mL) %40 amonyum sülfat konsantrasyonunda görüldü. Aktivitenin en düşük olduğu değer ise 1:2 ekstrakt:n-bütanol konsantrasyonunda (26,66 EU/mL) ve %80 amonyum sülfat konsantrasyonunda (60,54 EU/mL) hesaplandı.

Saflaştırılan Pektin Liyaz İzoenzimlerinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrophorez Sonuçları

L. plantarum, *A. pallidus* ve *P. fragi*’den üretilen ve ÜFA metoduna göre saflaştırılan PL enziminin alt birim sayısı ve molekül ağırlığı SDS poliakrilamid jel elektrophorezi ile gösterildi. SDS poliakrilamid jel elektrophorezi sonucunda *L. plantarum*’dan saflaştırılan pektin liyaz enzimi 39 kDA, *A. pallidus*’dan saflaştırılan pektin liyaz enzimi 18 kDA, *P. fragi*’den saflaştırılan pektin liyaz enzimi 65 kDA olarak belirlendi. Molekül ağırlığını belirlemek için düşük molekül ağırlıklı standart protein karışımı kullanılarak Rf değerinden molekül ağırlıkları hesaplandı (Şekil 19).



Şekil 19. Üçlü faz ayırma yöntemi ile saflaştırılan PL enziminin SDS-PAGE görüntüsü. I: Standart protein örneği, II: *L. plantarum* bakterisinden saflaştırılan PL enzimi, III: *P. fragi* bakterisinden saflaştırılan PL enzimi, IV: *A. pallidus* bakterisinden saflaştırılan PL enzimi.

Saflaştırılan Pektin Liyaz İzoenziminin Hibrit Yapısının Sentezi ve Karakterizasyonu

L. plantarum, *A. pallidus* ve *P. fragi*'den saflaştırdığımız pektin liyaz enziminin yapısını daha kararlı olmasını sağlamak için kitosan ile hibrit yapıları sentezlendi. Sentezlenen hibrit enzimlerin yapısı SEM, TEM, XRD ve FT-IR analizleri kullanılarak karakterize edildi ve enzimin optimum pH, optimum sıcaklık, stabil sıcaklık, stabil pH, V_{max} ve K_m değerleri, metal iyonları etkileri ve meyve suyu durultma çalışmaları yapıldı.

Saflaştırılan Pektin Liyaz İzoenzimlerinin Hibrit Bağlanma Oranının Belirlenmesi

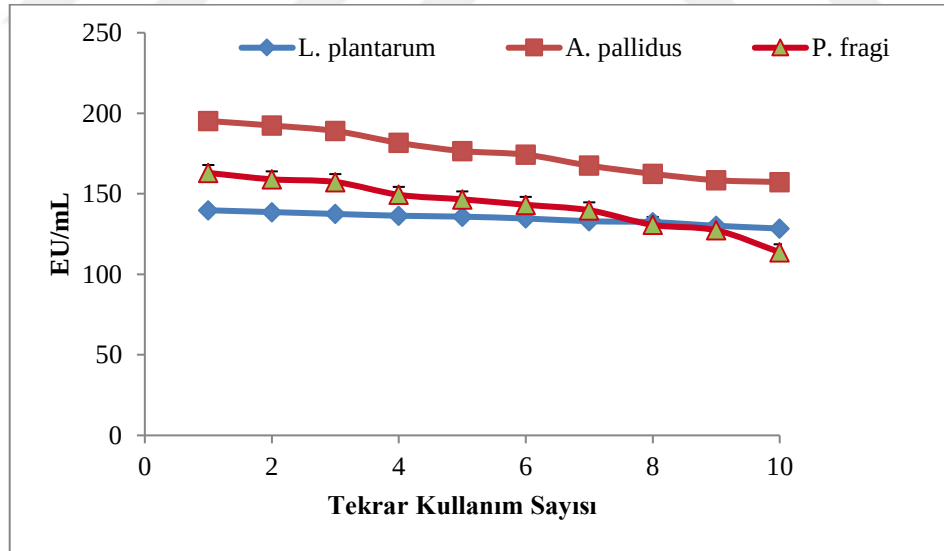
L. plantarum, *A. pallidus* ve *P. fragi*'den üretilerek ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan pektin liyaz enziminin hibrit bağlanma oranları Tablo 8'de verildi.

Tablo 8. PL Enziminin Hibrit Bağlanma Oranları

Bakteri	Hibrite % enzim bağlanma oranı
<i>L. plantarum</i>	86,90
<i>A. pallidus</i>	87,80
<i>P. fragi</i>	89,57

Saflaştırılan Pektin Liyaz İzoenzimlerinin Hibrit Yapısının Tekrar Kullanılabilirliği

L. Plantarum, *A. pallidus* ve *P. fragi*’den üretilerek ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan PL enzimi ile oluşturulan hibrit yapısının tekrar kullanılabilirliği Şekil 20’de verildi. *L. plantarum* bakterisinden üretilerek ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan PL enzimi ile oluşturulan hibrit yapısının pektin substratı ile 10 kez tekrar kullanılabilirliği araştırıldı ve başlangıç aktivitesinin %91,9’unu koruduğu hesaplandı. *A. pallidus* bakterisinden üretilerek ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan PL enzimi ile oluşturulan hibrit yapısının pektin substratı ile 10 kez tekrar kullanılabilirliği çalışıldı ve başlangıç aktivitesinin %80,6’sını koruduğu hesaplandı. *P. fragi* bakterisinden üretilerek ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan PL enzimi ile oluşturulan hibrit yapısının pektin substratı ile 10 kez tekrar kullanılabilirliği araştırıldı ve başlangıç aktivitesinin %75,7’sini koruduğu belirlendi.



Şekil 20. Hibrit PL enziminin pektin substratı ile hidrolizi için tekrar kullanılabilirliği esnasında aktivitesindeki değişim

Saflaştırılan Pektin Liyaz İzoenzimlerinin Hibrit Yapısının SEM, EDX Karakterizasyonu

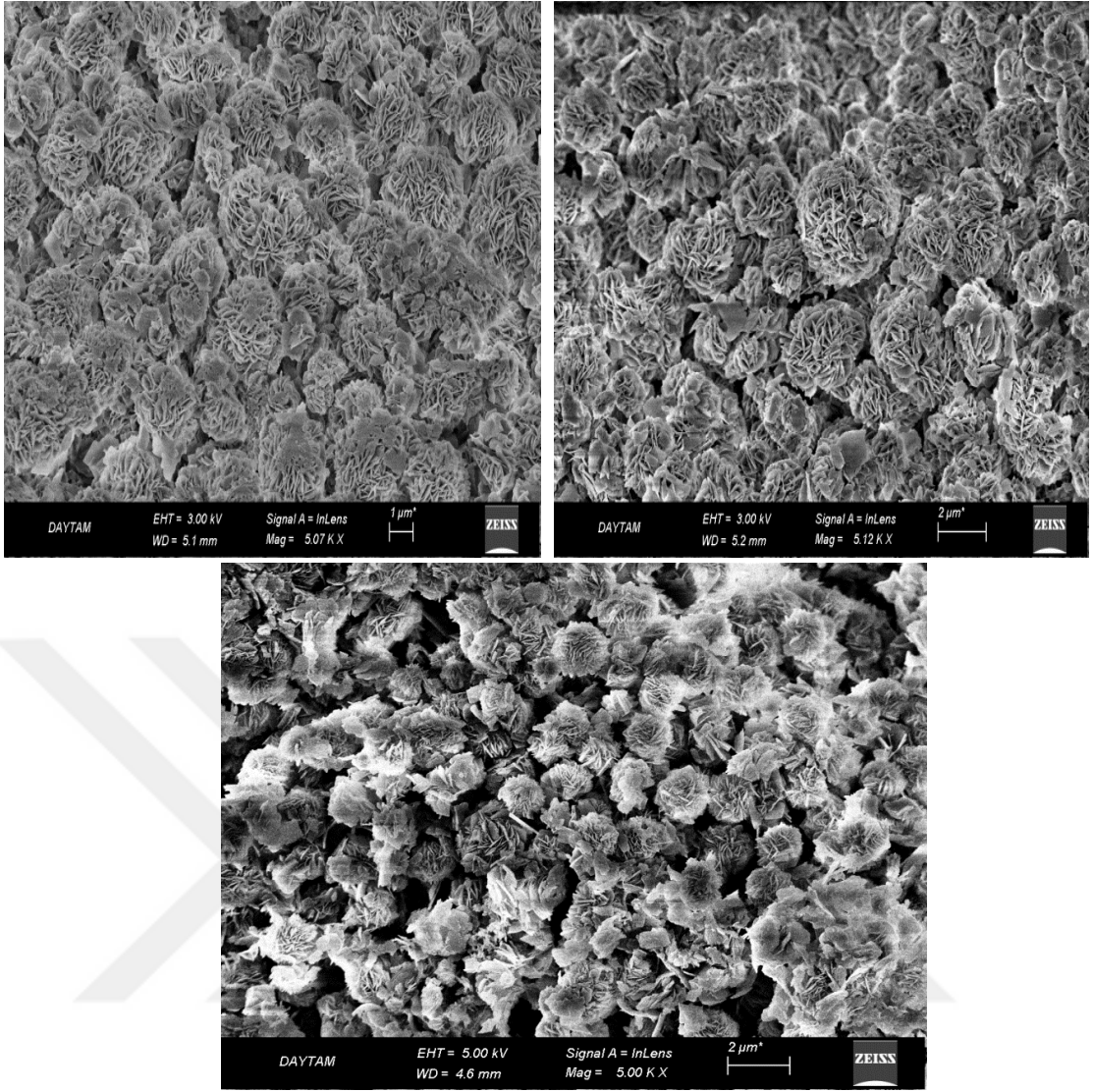
Hibrit nanoçiçek pektin liyaz enzim morfolojisinin görüntülenebilmesi için Zeiss marka Sigma 300 model taramalı elektron mikroskop (SEM) cihazı kullanıldı. Taramalı elektron mikroskobu, yüksek enerji demetleriyle çok küçük bir alana odaklanarak yüzeyin

taranması ile yüzeyden saçılan ikincil elektronların tarama pozisyonuna göre dedektörle algılanması ve numunenin morfolojik ve topografik görüntü alma yöntemidir.

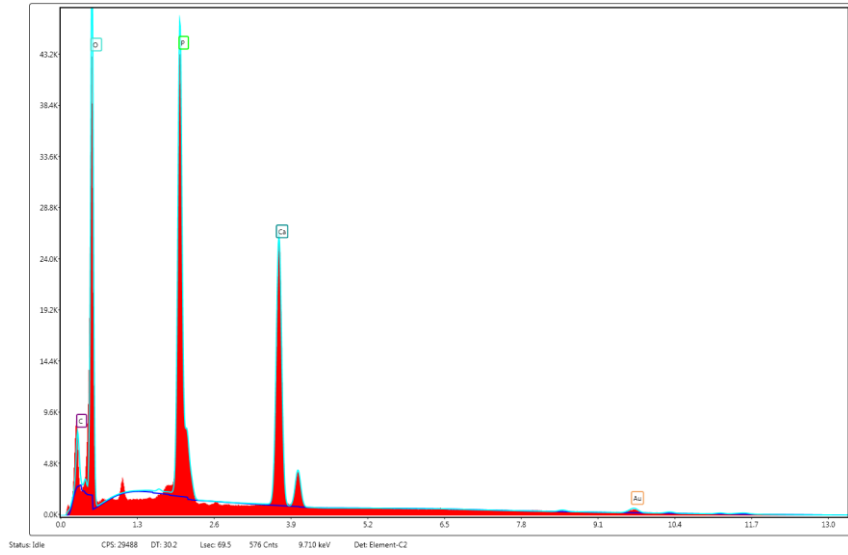
L. plantarum bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısının taramalı elektron mikroskobu (SEM) karakterizasyonuna ait görüntü kayıtları Şekil 21’de verildi. Hibrit nanoçiçek yapıları pH 5’te oluştuğu için tüm görüntüler pH 5 *L. plantarum* bakterisinden saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısına aittir. pH değeri artırıldığı zaman çiçeklerin yaprak yapılarının bozulduğu görüldü. EDX spektroskopisinde hibrit nanoçiçek PL yapısında Ca (%17,2), N (%3), O (%50) ve P (%15,6) oranında elementleri içermektedir (Tablo 9) (Şekil 22).

A. pallidus bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısının taramalı elektron mikroskobu (SEM) karakterizasyonuna ait görüntü kayıtları Şekil 23’de verildi. Hibrit nanoçiçek yapıları pH 5’te oluştuğu için tüm görüntüler pH 5 *A. pallidus* bakterisinden saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısına aittir. EDX spektroskopisinde hibrit nanoçiçek PL yapısında Ca (%16,9), O (%45) ve P (%16,4) oranında elementleri içermektedir (Tablo 10) (Şekil 24).

P. fragi bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısının taramalı elektron mikroskobu (SEM) karakterizasyonuna ait görüntü kayıtları Şekil 25’de verildi. Hibrit nanoçiçek yapıları pH 5’te oluştuğu için tüm görüntüler pH 5’te *P. fragi* bakterisinden saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısına aittir. EDX spektroskopisinde hibrit nanoçiçek PL yapısında Ca (%12,3), N (%6,8), O (%48,4) ve P (%14,1) oranında elementleri içermektedir (Tablo 11) (Şekil 26).



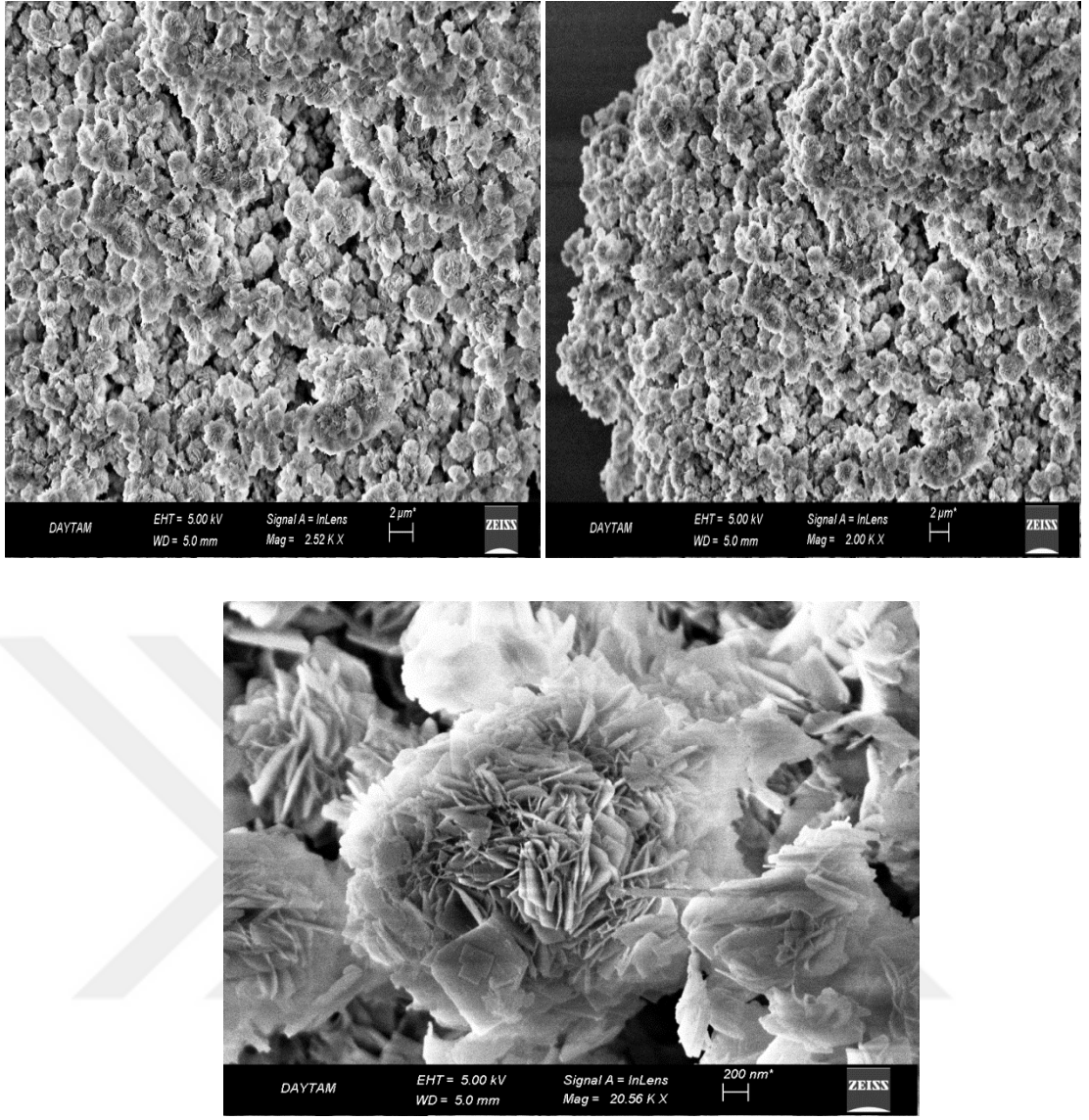
Şekil 21. *L. plantarum* bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin pH 5'te hibrit nanoçiçek yapısı



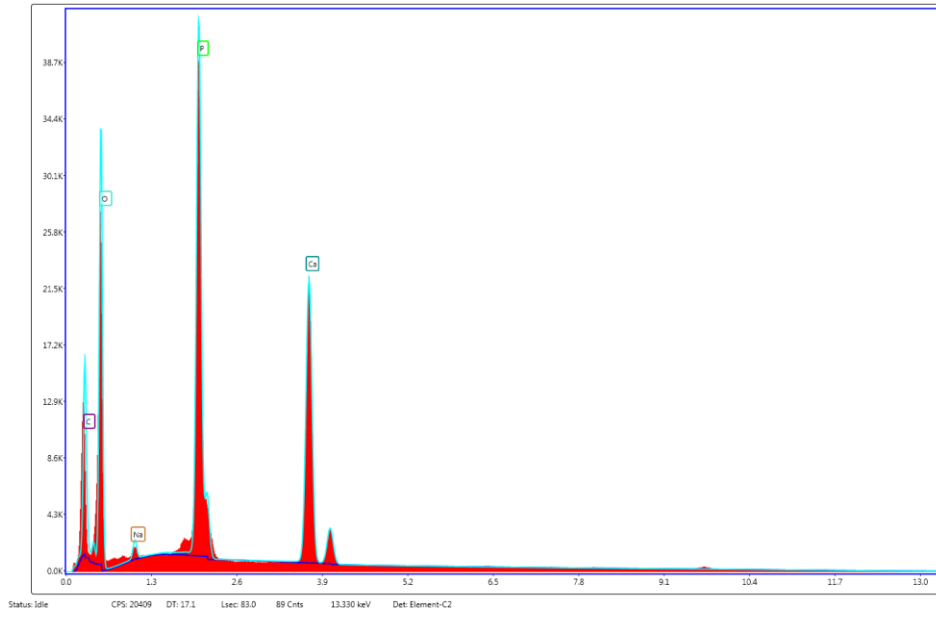
Şekil 22. *L. plantarum* bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin pH 5'te hibrit nanoçiçek yapısının EDX yapısı

Tablo 9. *L. plantarum* Bakterisinden Üretilerek Saflaştırılan PL Enziminin pH 5'te Hibrit Nanoçiçek Yapısının EDX Analiz Sonuçları

Element	Weight %	Atomic %	Error %	Net Int.	K Ratio	Z	R	A	F
C K	7,1	12	10,1	381,7	0,0168	1,11	0,9353	0,2132	1
N K	3	4,3	13,4	114,5	0,0041	1,0859	0,9473	0,127	1
O K	50	63,5	9,3	4208	0,0985	1,0647	0,9579	0,185	1
Na K	0,7	0,6	11,8	92,4	0,002	0,9692	0,9852	0,3134	1,0024
P K	15,6	10,2	2,8	5634,5	0,1234	0,9337	1,0144	0,8405	1,0101
Ca K	17,2	8,7	2,1	4066	0,1506	0,9194	1,0428	0,9345	1,0183
Au L	6,5	0,7	11,8	117,5	0,0448	0,5503	1,1405	1,0425	1,2106



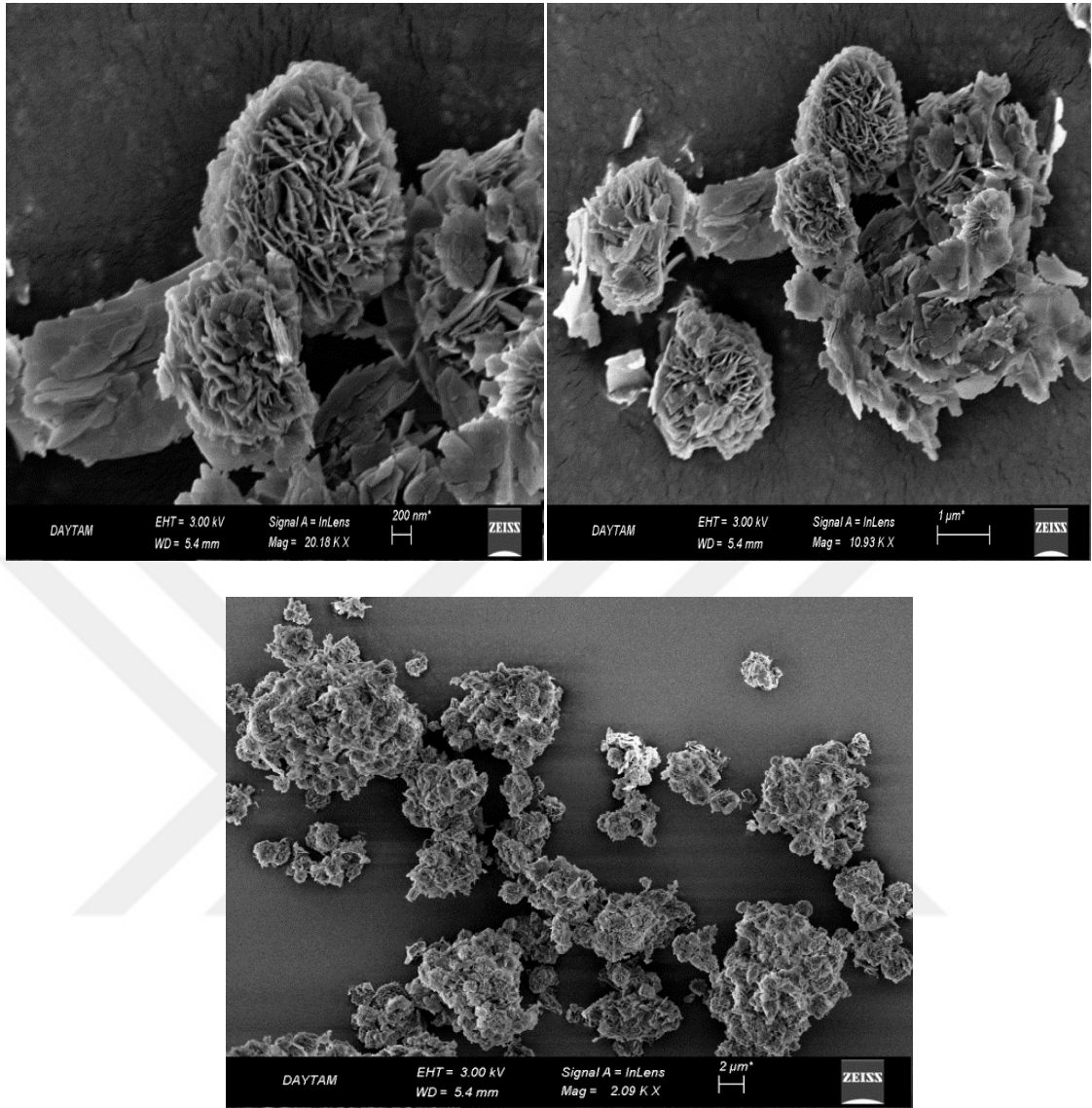
Şekil 23. *A. pallidus* bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin pH 5'te hibrit nanoçiçek yapısı



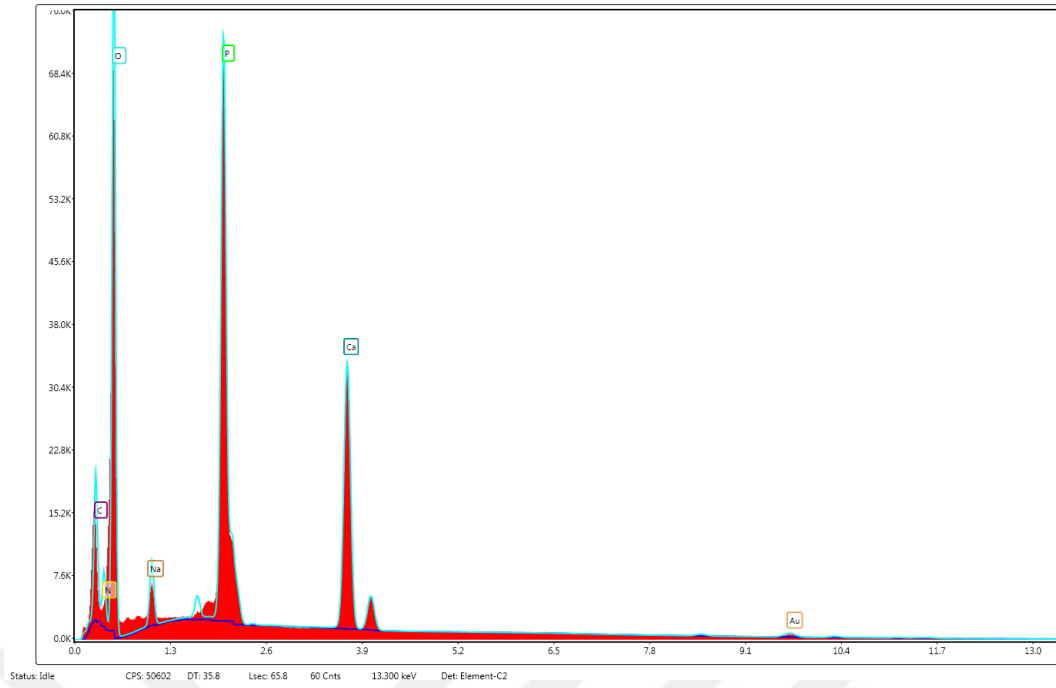
Şekil 24. *A. pallidus* bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin pH 5'te hibrit nanoçiçek yapısının EDX grafiği

Tablo 10. *A. pallidus* Bakterisinden Üretilerek Saflaştırılan pl Enziminin pH 5'te Hibrit Nanoçiçek Yapısının EDX Analiz Sonuçları

Element	Weight %	Atomic %	Error %	Net Int.	K Ratio	Z	R	A	F
C K	20,6	31	9,3	786,4	0,0479	1,0785	0,9571	0,2158	1
O K	45	50,9	9,5	2381,9	0,0772	1,033	0,9783	0,166	1
Na K	1,2	0,9	9,7	120,9	0,0036	0,9389	1,0040	0,3359	1,004
P K	16,4	9,6	2,5	4297,9	0,1302	0,9031	1,0310	0,8698	1,012
Ca K	16,9	7,6	1,7	2897,6	0,1485	0,8879	1,0568	0,9744	1,015



Şekil 25. *P. fragi* bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin pH 5'te hibrit nanoçiçek yapısı



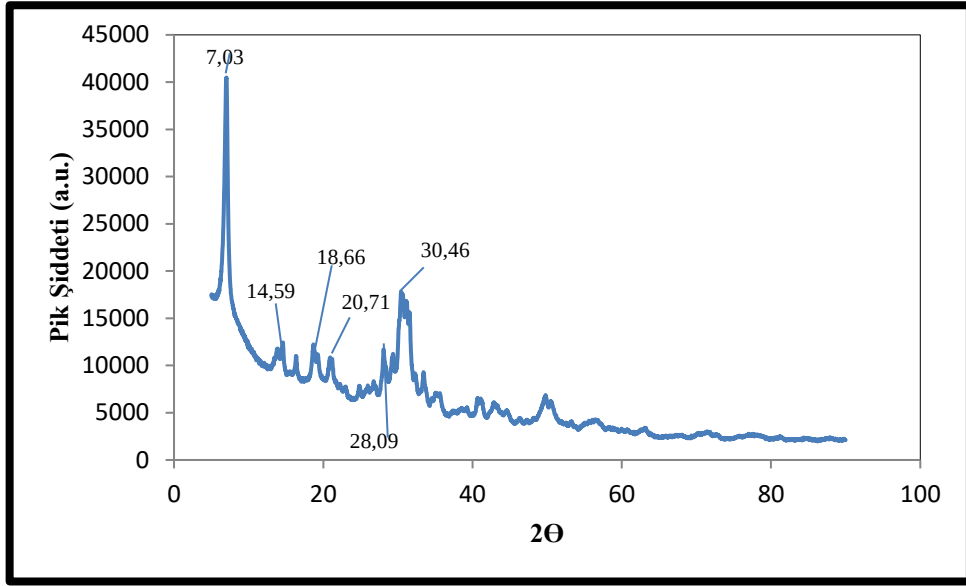
Şekil 26. *P. fragi* bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin pH 5'te hibrit nanoçiçek yapısının EDX yapısı

Tablo 11. *P. fragi* Bakterisinden Üretilerek Saflaştırılan PL Enziminin pH 5'te Hibrit Nanoçiçek Yapısının EDX Analiz Sonuçları

Element	Weight %	Atomic %	Error %	Net Int.	K Ratio	Z	R	A	F
C K	11,5	17,8	9,3	1190,2	0,0279	1,0895	0,9497	0,2232	1
N K	6,8	9	10,6	521,3	0,0099	1,0653	0,9612	0,137	1
O K	48,4	56,3	9,2	7560,4	0,0943	1,0441	0,9714	0,1865	1
Na K	3	2,4	8,3	809,6	0,0094	0,9496	0,9976	0,3273	1,0025
P K	14,1	8,5	2,7	9419,9	0,1099	0,9139	1,0254	0,8453	1,0095
Ca K	12,3	5,7	1,9	5443,6	0,1074	0,8992	1,0522	0,9538	1,0194
Au L	3,9	0,4	10,3	136,1	0,0276	0,5365	1,1441	1,0446	1,2615

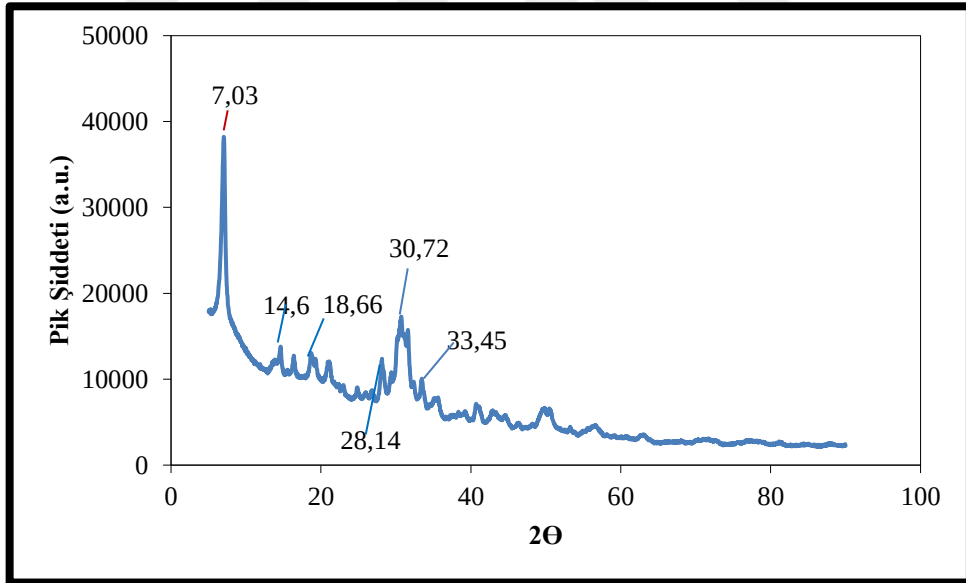
***L. plantarum*, *A. pallidus* ve *P. fragi*'den Üretilen ve Üçlü Faz Ayırma Metoduna Göre Saflaştırılan Pektin Liyaz Enziminin Hibrit Yapısının XRD Analiz Sonuçları**

L. plantarum bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısına ait Şekil 27'de verilen XRD grafiğine göre 7,03°, 14,59°, 18,66°, 20,71°, 28,09° ve 30,46°'lerde pik vermiştir.



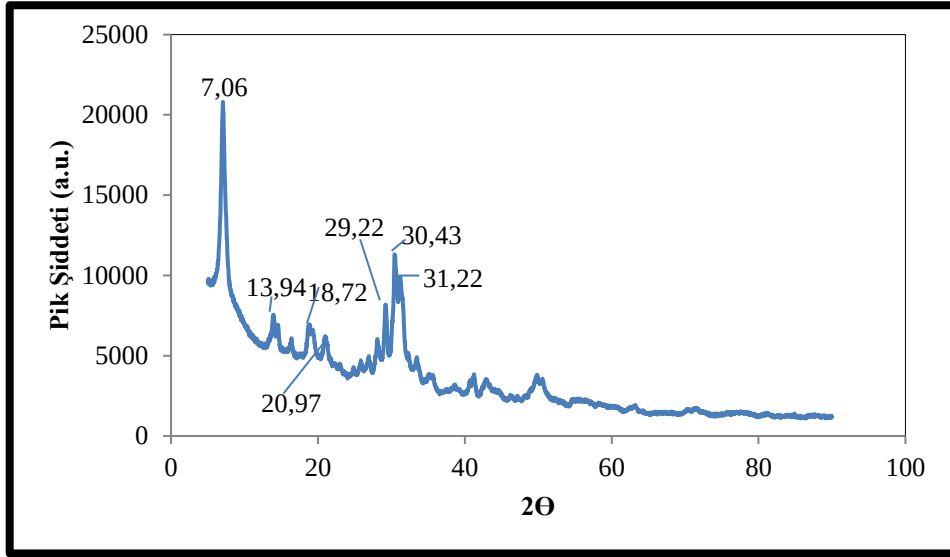
Şekil 27. *L. plantarum* bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısına ait XRD grafiği

A. pallidus bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısına ait Şekil 28’de verilen XRD grafiğine göre 7,03°, 14,6°, 18,66°, 28,14°, 30,72° ve 33,45°’lerde pik vermiştir.



Şekil 28. *A. pallidus* bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısına ait XRD grafiği

P. fragi bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısına ait Şekil 29’da verilen XRD grafiğine göre 7,06°, 13,94°, 18,72°, 20,97°, 29,22°, 30,43° ve 31,22°’lerde pik vermiştir.



Şekil 29. *P. fragi* bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısına ait XRD grafiği

L. plantarum, *A. pallidus* ve *P. fragi* bakterilerinden saflaştırılan hibrit PL enziminin grafikleri incelendiğinde hibrit nanoçiçek yapısında bulunan Ca yapısı, tripolifosfat ve enzim yapısında bulunan karbohidrat birimlerine ait piklerdir (Wang *et al.* 2014). Elde edilen verilere göre hibrit nanoçiçek kristal yapısının oluştuğunu desteklemektedir.

***L. plantarum*, *A. pallidus* ve *P. fragi*'den Üretilen ve Üçlü Faz Ayırma Metoduna Göre Saflaştırılan Pektin Liyaz Enziminin Hibrit Yapısının FT-IR Analiz Sonuçları**

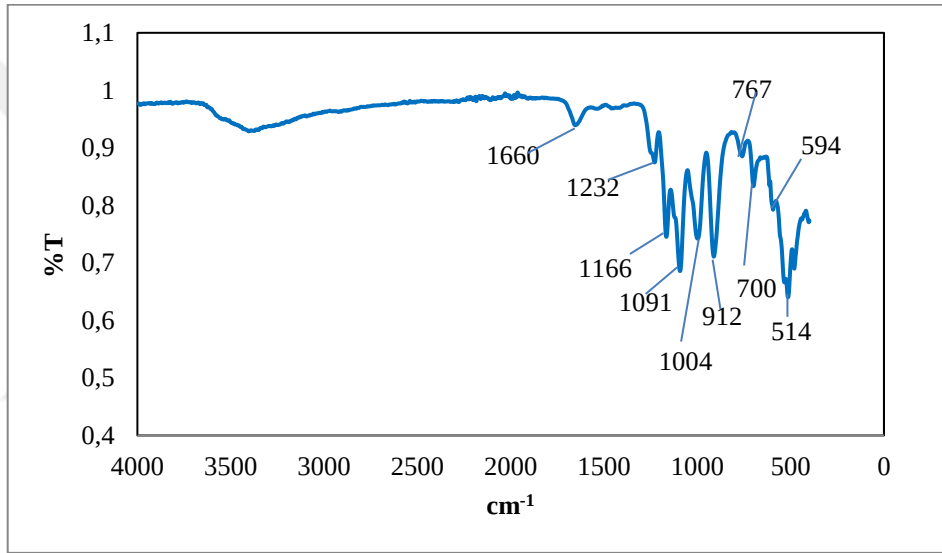
L. plantarum, *A. pallidus* ve *P. fragi*'den üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan pektin liyaz enziminin hibrit nanoçiçek yapısının FT-IR analiz sonuçları sırasıyla Şekil 30, Şekil 31 ve Şekil 32'de verildi.

L. plantarum'dan üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısının FT-IR spektrumu analiz sonuçları incelendiğinde 1660 cm^{-1} , 1232 cm^{-1} , 1166 cm^{-1} , 1091 cm^{-1} , 1004 cm^{-1} , 912 cm^{-1} , 767 cm^{-1} , 700 cm^{-1} , 594 cm^{-1} , 514 cm^{-1} 'de pikler görüldü.

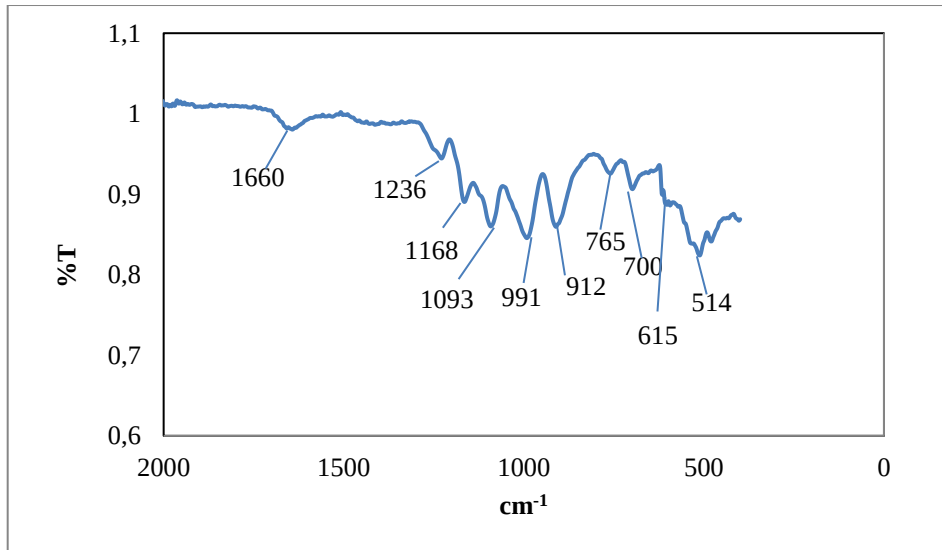
A. pallidus'dan üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısının FT-IR spektrumu analiz sonuçları incelendiğinde 1660 cm^{-1} , 1236 cm^{-1} , 1168 cm^{-1} , 1093 cm^{-1} , 991 cm^{-1} , 912 cm^{-1} , 765 cm^{-1} , 700 cm^{-1} , 615 cm^{-1} , 514 cm^{-1} 'de pikler görüldü.

P. fragi'den üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısının FT-IR spektrumu analiz sonuçları incelendiğinde 1664 cm^{-1} , 1253 cm^{-1} , 1168 cm^{-1} , 1093 cm^{-1} , 995 cm^{-1} , 914 cm^{-1} , 756 cm^{-1} , 698 cm^{-1} , 615 cm^{-1} , 595 cm^{-1} , 538 cm^{-1} , 514 cm^{-1} 'de pikler görüldü.

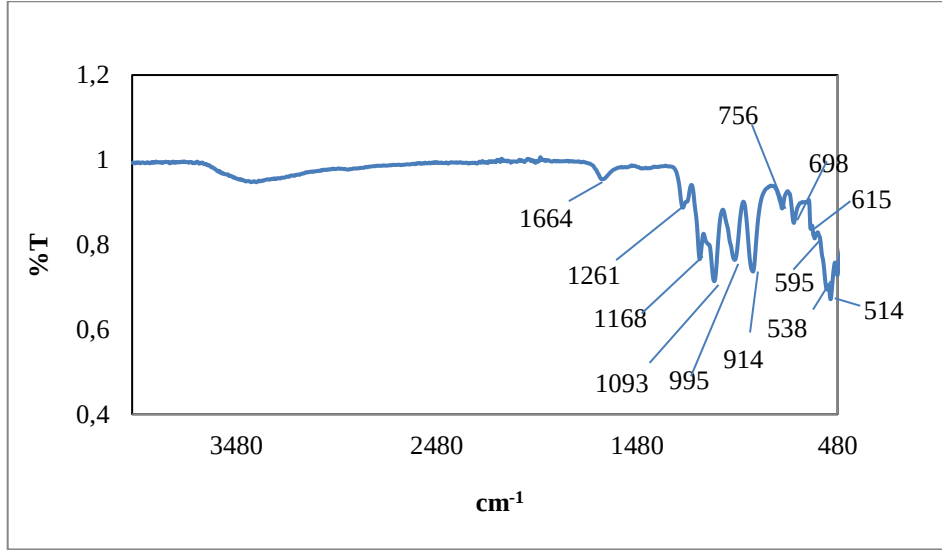
L. plantarum, *A. pallidus* ve *P. fragi* bakterilerinden üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan pektin liyaz enziminin hibrit nanoçiçek yapısının FT-IR analiz sonuçlarında 3440 ve 1649 cm^{-1} 'deki bantlar, sırasıyla su moleküllerinin gerilme ($\nu\text{O-H}$) ve eğilme (δHOH) titreşimlerini göstermektedir. 919, 912, 767, 765, 756, 703, 700 ve 698 cm^{-1} 'deki bantlar, $\text{P}_3\text{O}_{10}^{-5}$ ve $\text{P}_2\text{O}_7^{-4}$ 'ün kızılötesi spektrumu ile tutarlı olan vs POP simetrik titreşimlerinin karakteristiğidir. 756 ve 765 cm^{-1} 'deki bant, bir $\text{P}_3\text{O}_{10}^{-5}$ trifosfat yapısı ile karakterize edildi. 536 cm^{-1} 'deki bant, fosfatların $\text{P}_3\text{O}_{10}^{-5}$ ve $\text{P}_2\text{O}_7^{-4}$ ile bükülme titreşimini gösterdi. FT-IR spektrumları, nanoçiçeklerde tripolifosfat ve kalsiyum pirofosfat hidratın varlığını doğruladı. Bu nedenle nanoçiçekler kitosan-tripolifosfat nanokompleksleri ve kalsiyum pirofosfat hidrat kristallerinin karışımı olarak tanımlandı. Babagil tarafından yapılan çalışma sonuçlarımızı desteklemektedir (Babagil, 2018; Ghebleh, 2017).



Şekil 30. *L. plantarum*'dan üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısının FT-IR spektrumu analiz sonuçları



Şekil 31. *A. pallidus*'dan üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısının FT-IR spektrumu analiz sonuçları

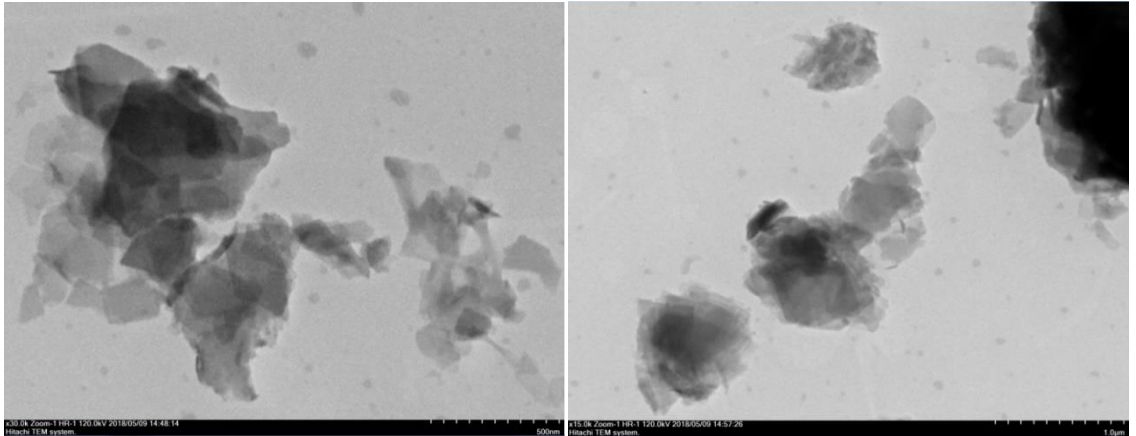


Şekil 32. *P. fragi*'den üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısının FT-IR spektrumu analiz sonuçları

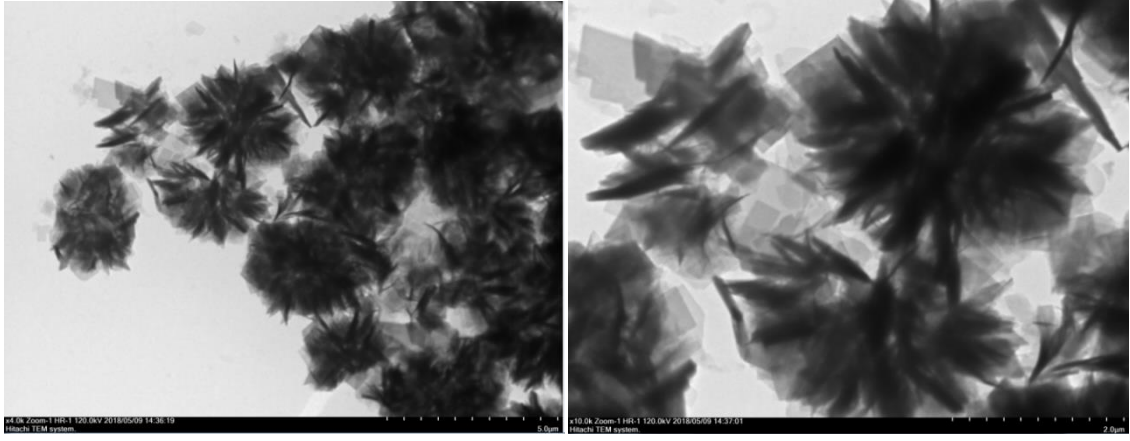
Saflaştırılan Pektin Liyaz İzoenzimlerinin Hibrit Yapısının TEM Analiz Sonuçları

Hibrit nanoçiçek pektin liyaz enzim morfolojisinin görüntülenmesi Zeiss PAN Analytical Empyrean X-Ray Difraktometresi (UK) cihazı ile DAYTAM'da yapıldı. Tüm nanoçiçek hibrit PL yapılarına ait TEM görüntüleri Şekil 33-35'te verildi.

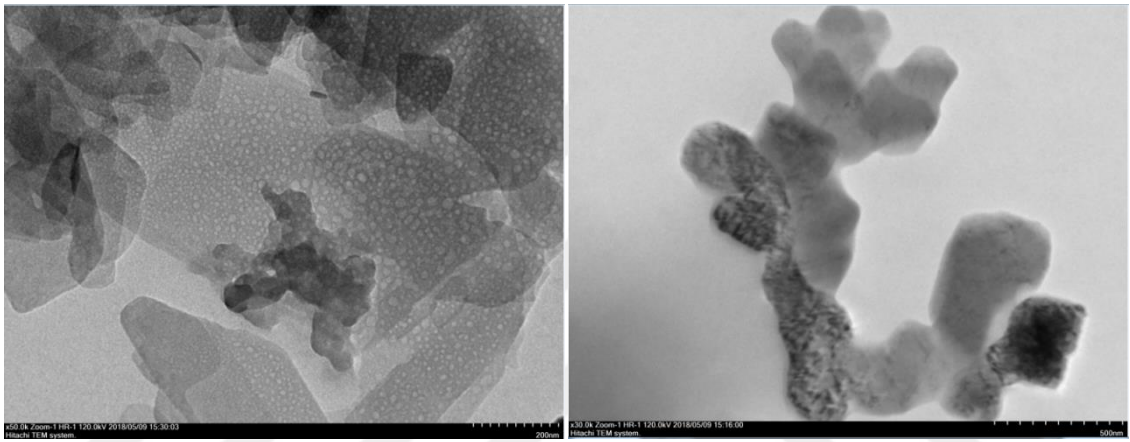
L. plantarum, *A. pallidus* ve *P. fragi*'den üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan pektin liyaz enziminin hibrit nanoçiçek yapısının TEM analiz sonuçlarına göre üç enzimin TEM görüntüleri hiyerarşik kalıp şeklinde mikro gözenekli yapılar nano yapılar olduğu görüldü.



Şekil 33. *L. plantarum*'dan üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısının TEM analiz sonuçları



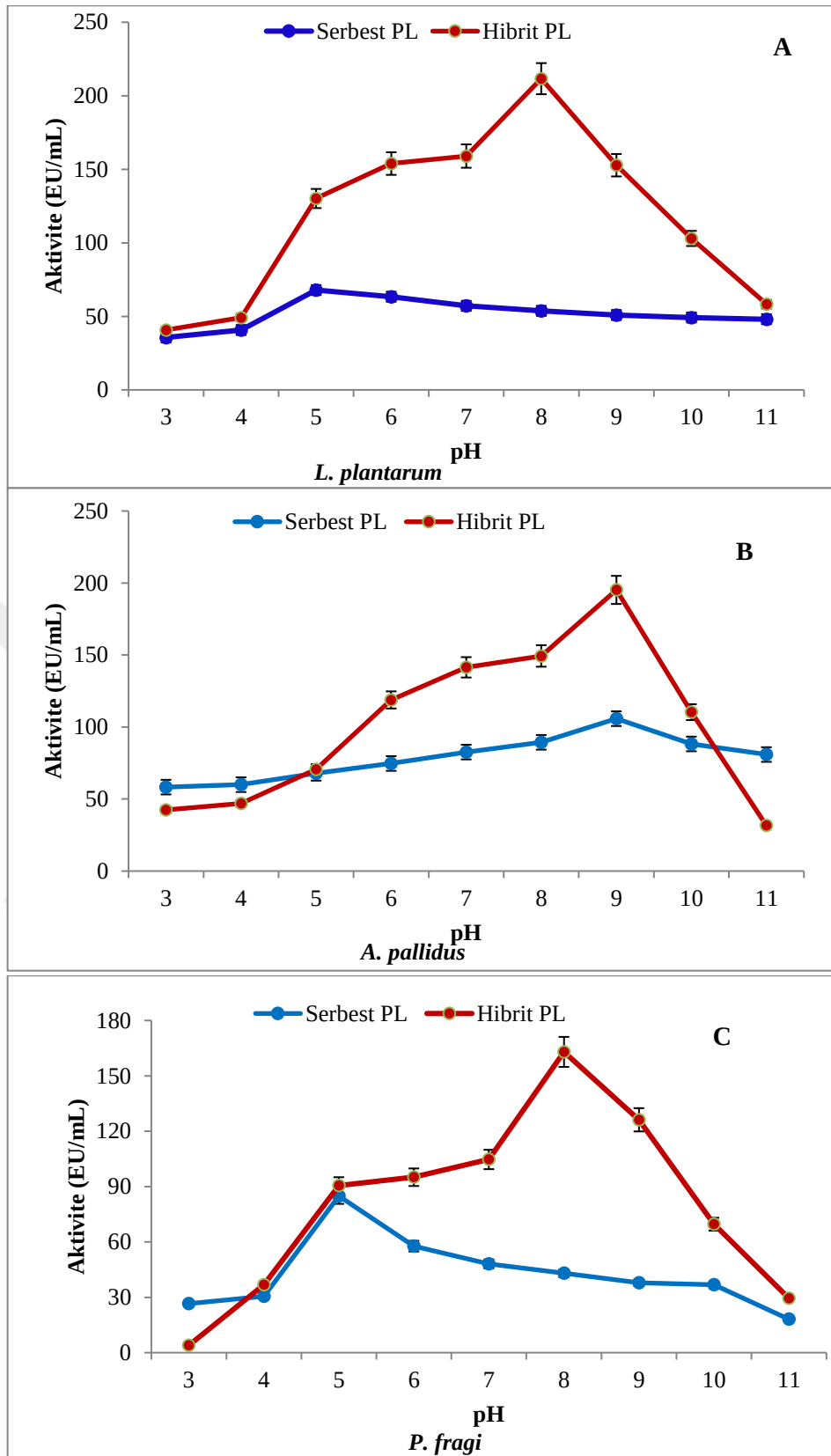
Şekil 34. *A. pallidus*’dan üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısının TEM analiz sonuçları



Şekil 35. *P. fragi*’den üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısının TEM analiz sonuçları

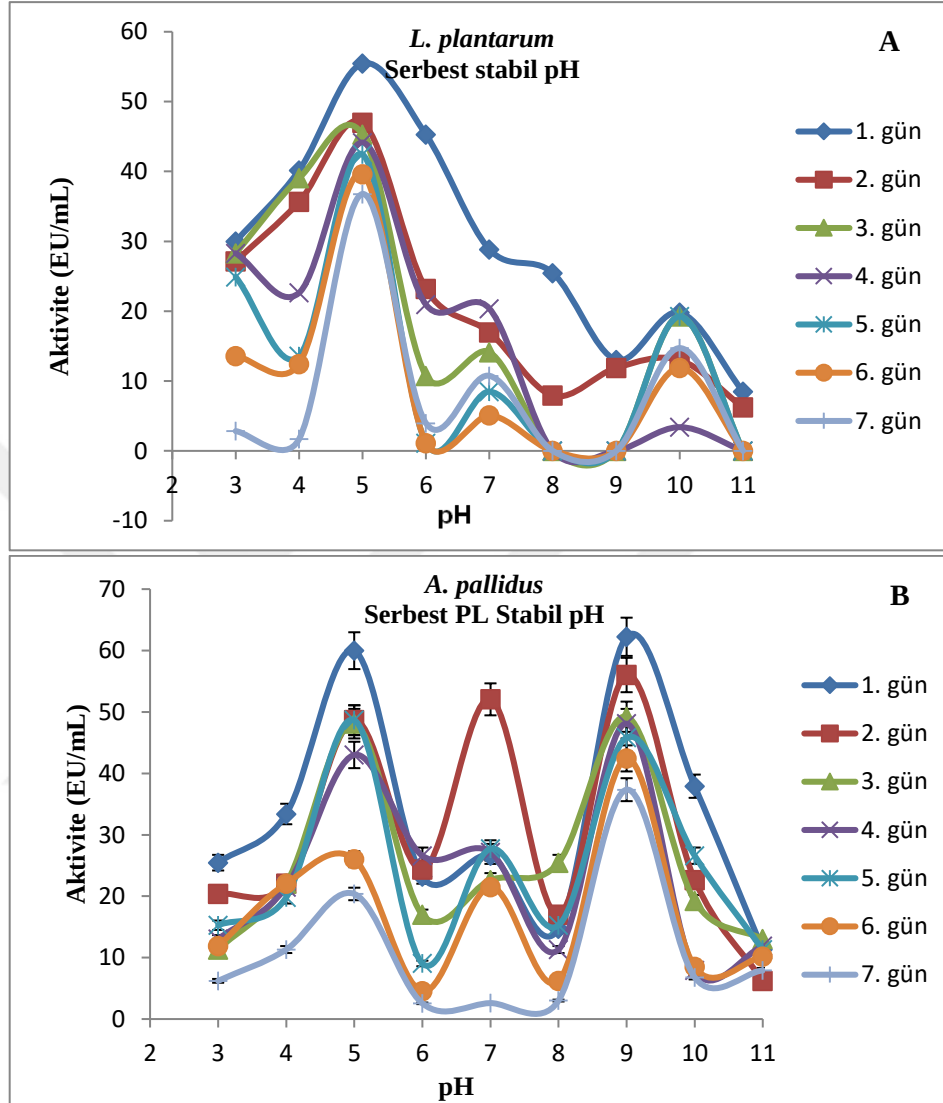
Saflaştırılan Serbest ve Hibrit pl Optimum pH, Optimum Sıcaklık, Stabil pH ve Stabil Sıcaklık Sonuçları

L. plantarum, *A. pallidus* ve *P. fragi*’den saflaştırdığımız pektin liyaz enziminin serbest ve hibrit pektin liyaz enziminin optimum pH değerleri farklı tampon çözeltileri kullanılarak pH 3-11 aralığında çalışıldı ve bu verilere ait grafikler Şekil 36 A-C’de verildi. *L. plantarum* ve *P. fragi*’den saflaştırılan PL enzimi için pH 5’de, *A. pallidus*’dan saflaştırılan PL enzimi için pH 9’da optimum aktivite görüldü. Hibrit PL enziminin daha kararlı yapıda ve aktif olduğu görüldü. *L. plantarum* ve *P. fragi*’den saflaştırılan PL enziminin hibrit yapısı için pH 8 ve *A. pallidus*’dan saflaştırılan PL enzimi hibrit yapısı için pH 9’da optimum aktivite görüldü. Elde edilen verilerden pH 4.0’ın altında ve pH 10,00’un üzerinde serbest ve hibrit PL enzimleri aktivite kaybı gösterdi.

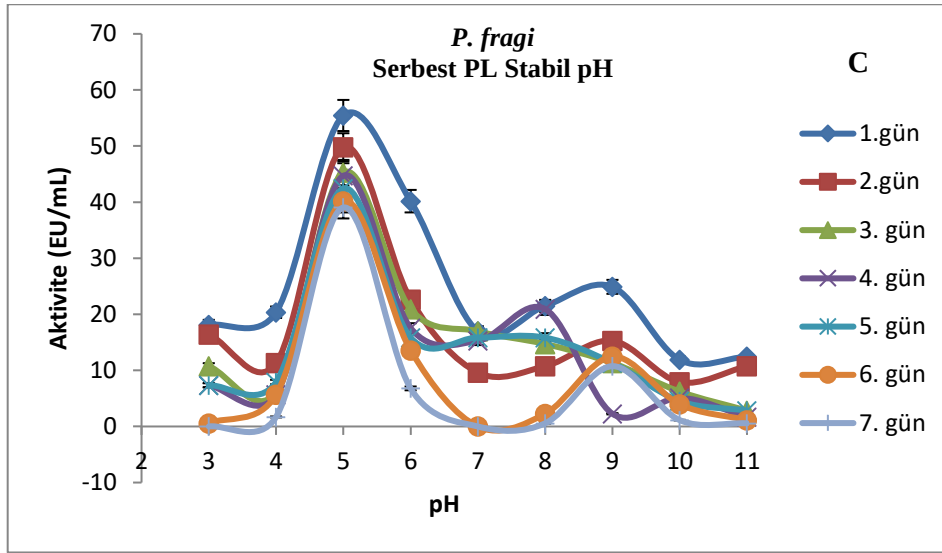


Şekil 36. A) *L. plantarum* B) *A. pallidus* C) *P. fragi* bakterilerinden saflaştırılan serbest ve hibrit PL enziminin optimum pH sonuçları

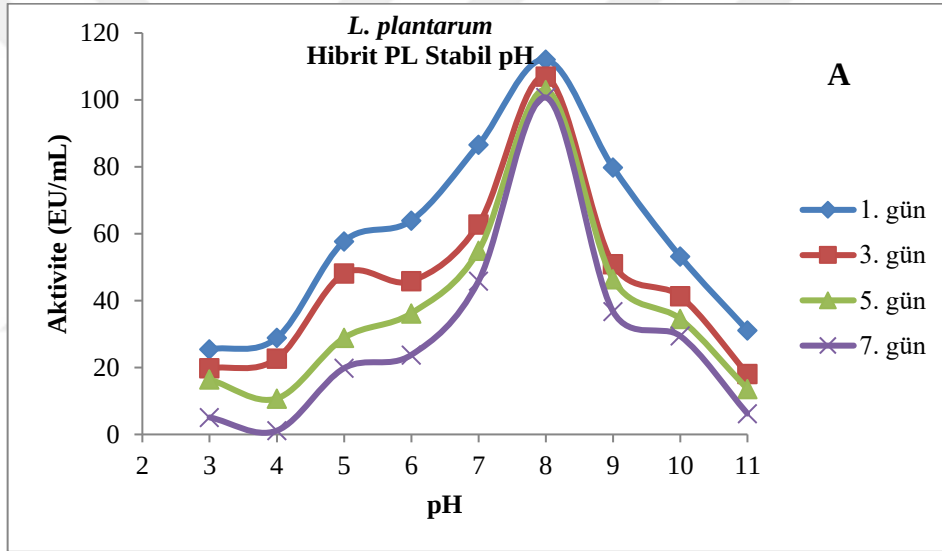
Serbest ve hibrit PL enzimi için pH 3-5 aralığında sodyum asetat, pH 6-8 sodyum dihidrojen fosfat, pH 9-11 aralığında glisin tampon çözeltisi kullanılarak 7 gün boyunca +4 °C’de inkübasyona tabi tutularak periyodik aralıklarla PL aktivite ölçümleri yapıldı. Serbest ve hibrit PL enzimlerinin ölçüm sonuçları Şekil 37 (A-C) ve Şekil 38 (A-C)’de verildi.



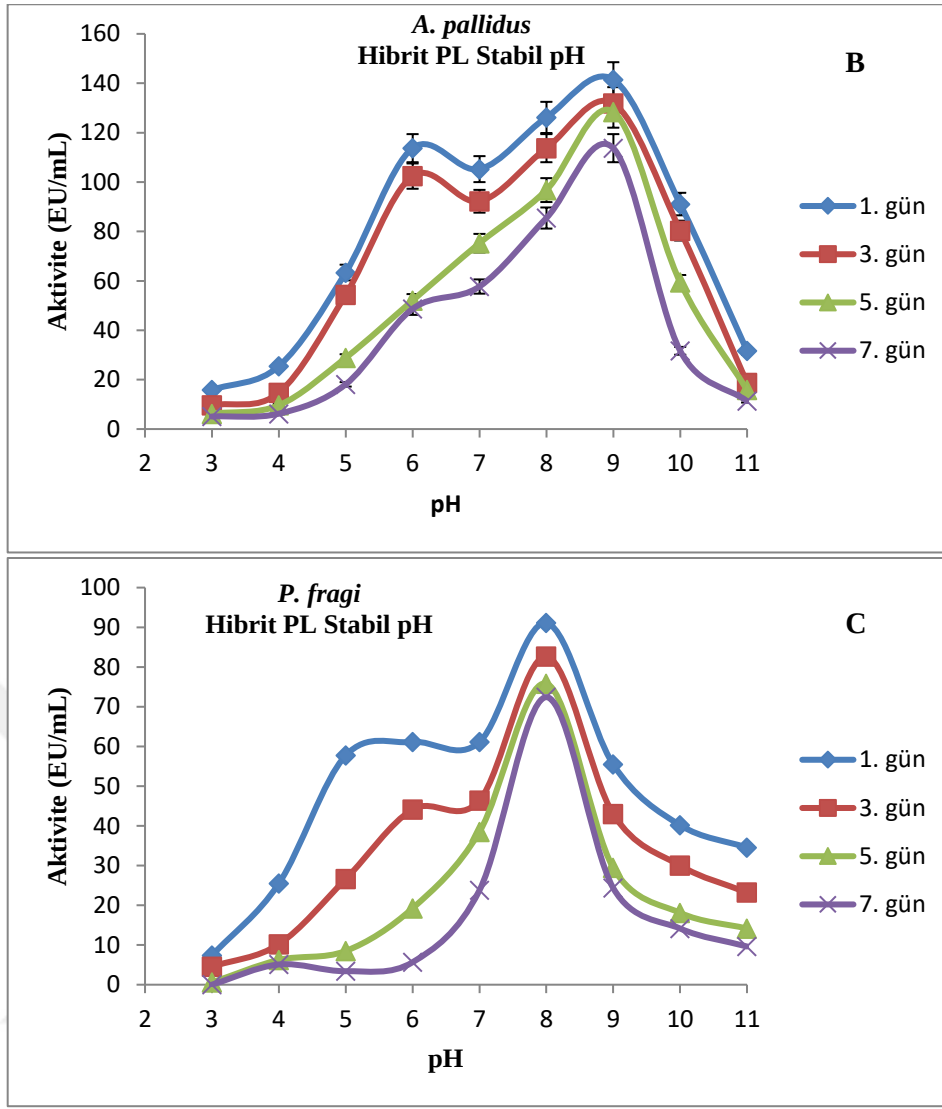
Şekil 37. A) *L. plantarum* B) *A. pallidus* C) *P. fragi* bakterilerinden saflaştırılan serbest PL enziminin stabil pH sonuçları



Şekil 37. A) *L. plantarum* B) *A. pallidus* C) *P. fragi* bakterilerinden saflaştırılan serbest PL enziminin stabil pH sonuçları (devamı)



Şekil 38. A) *L. plantarum* B) *A. pallidus* C) *P. fragi* bakterilerinden saflaştırılan hibrit PL enziminin stabil pH sonuçları



Şekil 38. A) *L. plantarum* B) *A. pallidus* C) *P. fragi* bakterilerinden saflaştırılan hibrit PL enziminin stabil pH sonuçları (devamı)

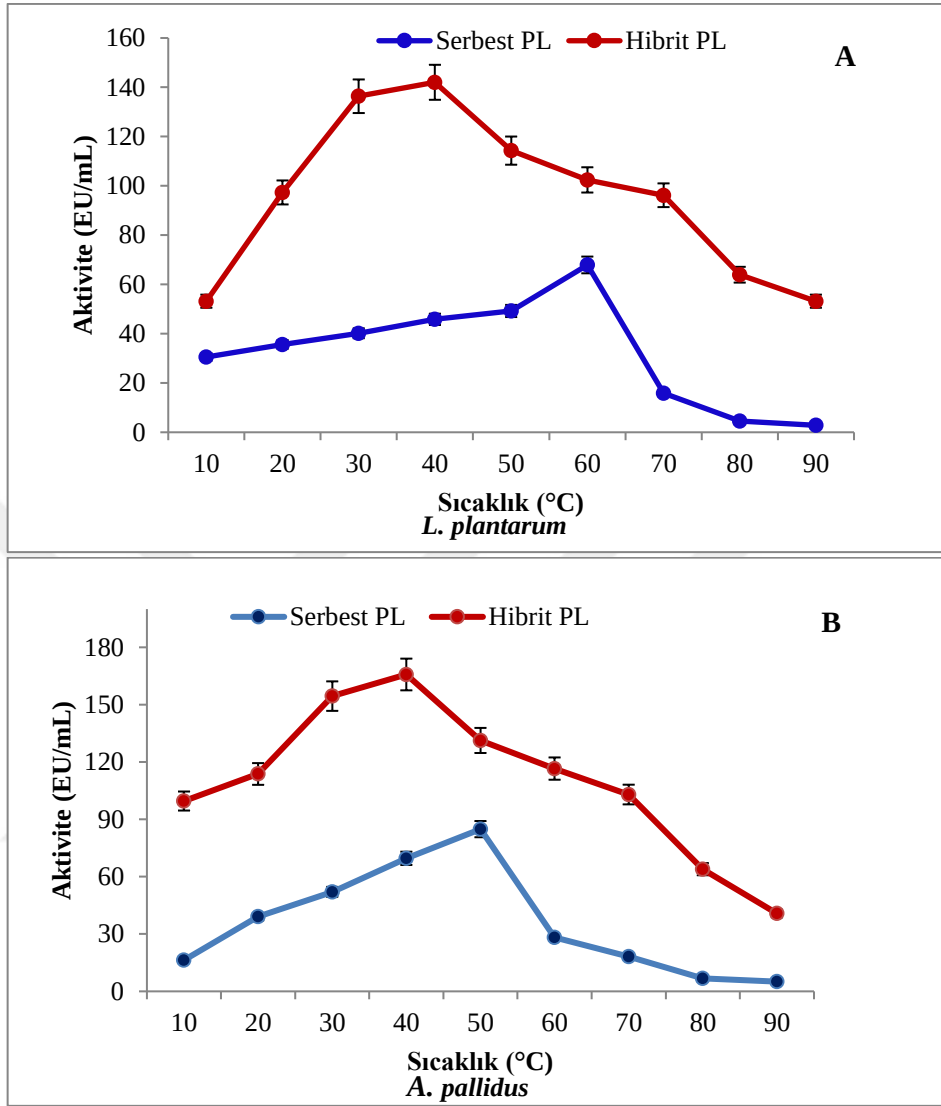
L. plantarum bakterisinden saflaştırılan PL enzimi serbest formda pH 5’de daha stabil ve 7 gün sonra ilk aktivitesinin %66,32 sini korurken hibrit yapıda ise pH 8’de daha stabil ve ilk aktivitesinin %90’ını koruduğu hesaplandı.

A. pallidus bakterisinden saflaştırılan PL enzimi serbest formda pH 9’da daha stabil ve 7 gün sonra ilk aktivitesinin %60’ını korurken hibrit yapıda ise pH 9’de daha stabil ve ilk aktivitesinin %80,4’ünü koruduğu hesaplandı.

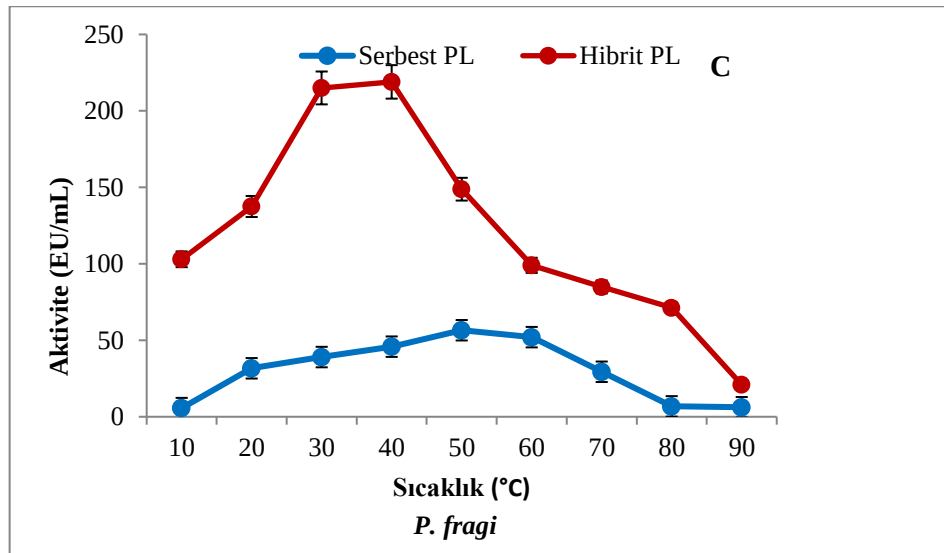
P. fragi bakterisinden saflaştırılan PL enzimi serbest formda pH 5’de daha stabil ve 7 gün sonra ilk aktivitesinin %70,9’ını korurken hibrit yapıda ise pH 8’de daha stabil ve ilk aktivitesinin %80’ini koruduğu hesaplandı.

L. plantarum, *A. pallidus* ve *P. fragi*’den saflaştırdığımız pektin liyaz enziminin serbest ve hibrit pektin liyaz enziminin optimum sıcaklık değeri 10-90 °C sıcaklık aralığında araştırıldı. Ölçülen aktivite değerlerine göre *L. plantarum* bakterisinden saflaştırılan serbest

PL enzimi için optimum sıcaklık 60 °C, *A. pallidus* ve *P. fragi*'den saflaştırılan serbest PL enzimi için ise 50 °C olduğu görüldü. *L. plantarum*, *A. pallidus* ve *P. fragi*'den bakterisinden saflaştırılan hibrit PL enzimi optimum sıcaklığı 40 °C olarak ölçüldü (Şekil 39. A-C).

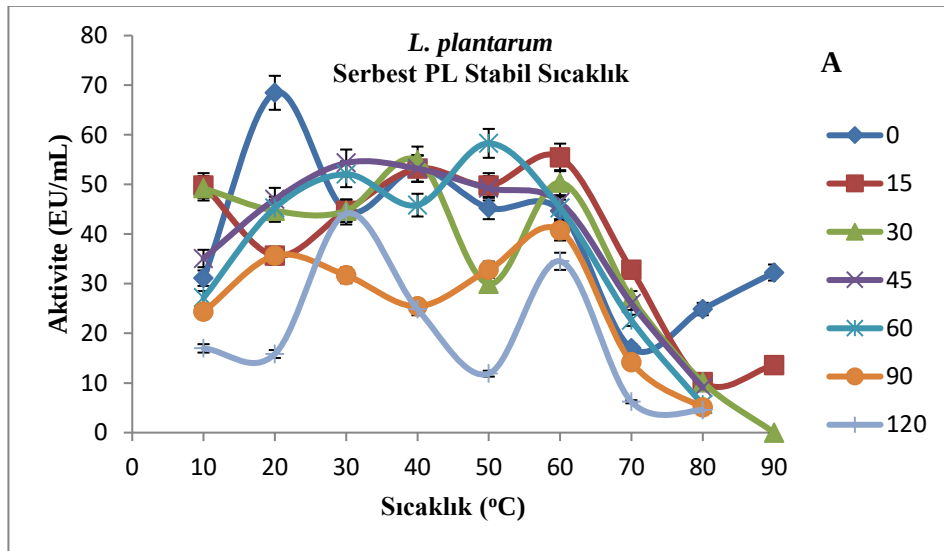


Şekil 39. A) *L. plantarum* B) *A. pallidus* C) *P. fragi* bakterilerinden saflaştırılan serbest ve hibrit PL enziminin optimum sıcaklık sonuçları

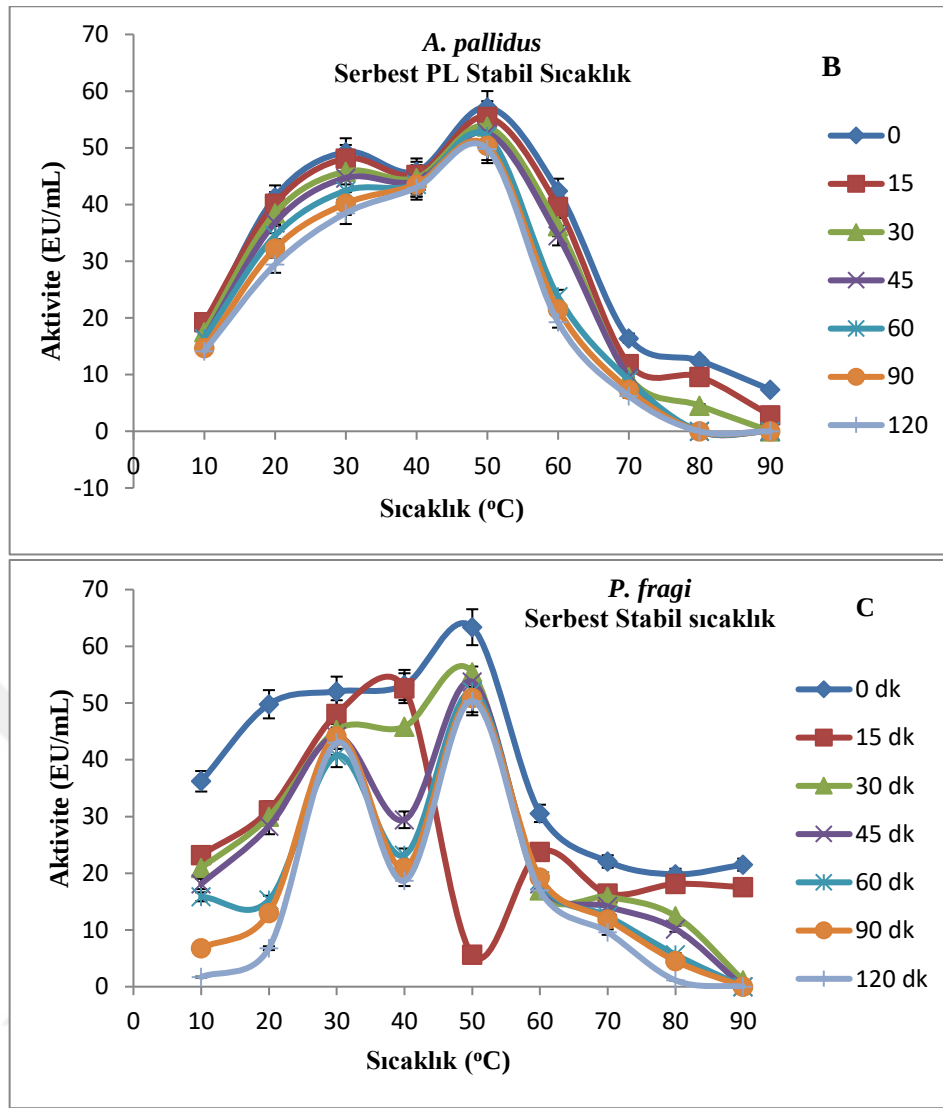


Şekil 39. A) *L. plantarum* B) *A. pallidus* C) *P. fragi* bakterilerinden saflaştırılan serbest ve hibrit PL enziminin optimum sıcaklık sonuçları (devamı)

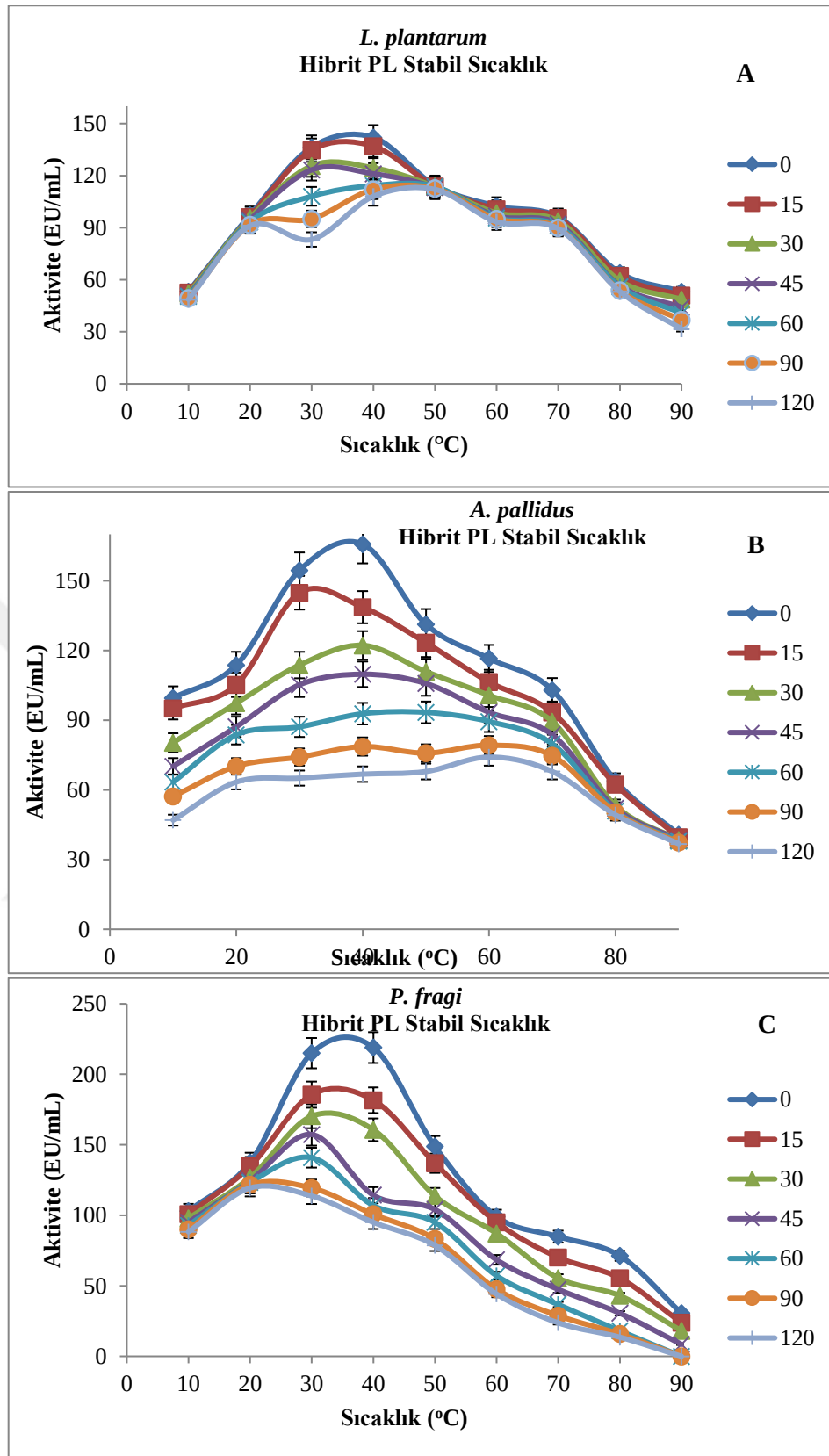
L. plantarum, *A. pallidus* ve *P. fragi*'den saflaştırdığımız pektin liyaz enziminin serbest ve hibrit pektin liyaz enziminin stabil sıcaklık değeri 10-90 °C aralığında 2 saat boyunca belirlenen sıcaklık değerinde inkübe edilerek araştırıldı. Ölçülen aktivite değerlerine göre *L. plantarum* bakterisinden saflaştırılan serbest PL enziminin 40 °C ve hibrit PL enziminin 50 °C'de, *A. pallidus* bakterisinden saflaştırılan serbest PL enziminin 40 °C ve hibrit PL enziminin 60 °C'de ve *P. fragi*'den saflaştırılan serbest PL enziminin 30 °C ve 50 °C, hibrit PL enziminin ise 20 °C ve 30 °C'de daha stabil olduğu görüldü (Şekil 40. A-C ve Şekil 41. A-C).



Şekil 40. A) *L. plantarum* B) *A. pallidus* C) *P. fragi* bakterilerinden saflaştırılan serbest PL enziminin stabil sıcaklık sonuçları



Şekil 40. A) *L. plantarum* B) *A. pallidus* C) *P. fragi* bakterilerinden saflaştırılan serbest PL enziminin stabil sıcaklık sonuçları (devamı)



Şekil 41. A) *L. plantarum* B) *A. pallidus* C) *P. fragi* bakterilerinden saflaştırılan hibrit PL enziminin stabil sıcaklık sonuçları

Saflaştırılan Serbest ve Hibrit PL İzoenzim Aktiviteleri Üzerine Hg₂²⁺, Ca²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ ve Mg²⁺ Metal İyonlarının *in vitro* Etkilerinin Sonuçları

L. Plantarum, *A. pallidus* ve *P. fragi*'den üretilerek ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan serbest ve hibrit PL enzim aktivitesi üzerine Hg₂²⁺, Ca²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ ve Mg²⁺ metal iyonları etkisi araştırıldı. Metal iyonunun ilave edilmediğı kontrol grubunun aktivitesi 100 olarak kabul edilerek 1 mM ve 5 mM konsantrasyonundaki % bağıl aktivite değerleri buna göre oranlanarak, serbest ve hibrit PL sonuçları sırası ile Tablo 12- 13- 14'de gösterildi.

L. plantarum bakterisinden üretilerek ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan serbest PL enzim aktivitesi üzerine 1 mM Hg₂²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺ ve Fe²⁺, 5 mM Hg₂²⁺, Ca²⁺, Fe³⁺ ve Zn²⁺ metal iyonları aktive ederken 1 mM Mg²⁺ ve Cu²⁺ metal iyonları inhibe etti. *L. plantarum* bakterisinden üretilerek ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan hibrit PL enzim aktivitesi üzerine 1 mM ve 5 mM Hg₂²⁺ hariç Ca²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ ve Mg²⁺ metal iyonlarının enzimleri aktive ettiğı belirlendi.

A. pallidus bakterisinden üretilerek ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan serbest PL enzim aktivitesi üzerine 1 mM ve 5 mM Hg₂²⁺ hariç Ca²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺ ve Ca²⁺ aktive etti. *A. pallidus* bakterisinden üretilerek ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan hibrit PL enzim aktivitesi üzerine 1 mM Hg₂²⁺, Ca²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ ve Mg²⁺ metal iyonlarının hepsi aktive etti ve 5 mM Hg₂²⁺ ve Cu²⁺ inhibe ederken Ca²⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, Mg²⁺ metal iyonlarının enzimleri aktive ettiğı belirlendi.

P. fragi'den üretilerek ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan serbest PL enzim aktivitesi üzerine 1 mM Cu²⁺, Hg₂²⁺, Ca²⁺, Fe³⁺, Zn²⁺ ve Mg²⁺ metal iyonları aktive etti. 5 mM Hg₂²⁺ ve Mg²⁺ inhibe ederken 5 mM Ca²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺ ve Zn²⁺ aktive etti. *P. fragi*'den üretilerek ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan hibrit PL enzim aktivitesi üzerine 1 mM Cu²⁺, Hg₂²⁺, Ca²⁺, Fe³⁺, Zn²⁺ ve Mg²⁺ metal iyonları aktive etti ve 5 mM Hg₂²⁺ inhibe ederken 5 mM Ca²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ ve Mg²⁺ metal iyonlarının enzimleri aktive ettiğı belirlendi.

Tablo 12. *L. plantarum*'dan Üretilip Saflaştırılan Pektin Liyaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} ve Hg_2^{2+} 'nın Etkisinin Sonuçları

<i>L. plantarum</i> Serbest PL				
Metal İyonları	Konsantrasyon (mM)	Bağlı Aktivite (%)	Konsantrasyon (mM)	Bağlı Aktivite (%)
Kontrol	-	100	-	100
Cu^{2+}	1	0	5	0
Hg_2^{2+}	1	16,67	5	20,83
Ca^{2+}	1	111,1	5	79,17
Mg^{2+}	1	0	5	0
Zn^{2+}	1	11,11	5	125
Fe^{2+}	1	5,56	5	70,83
<i>L. plantarum</i> Hibrit PL				
Metal İyonları	Konsantrasyon (mM)	Bağlı Aktivite (%)	Konsantrasyon (mM)	Bağlı Aktivite (%)
Kontrol	-	100	-	100
Cu^{2+}	1	12,67	5	108,33
Hg_2^{2+}	1	83,33	5	0
Ca^{2+}	1	131,67	5	237,5
Mg^{2+}	1	176,67	5	100
Zn^{2+}	1	173,33	5	295,83
Fe^{2+}	1	176,67	5	200

Tablo 13. *P. fragi*'den Üretilip Saflaştırılan Pektin Liyaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} ve Hg_2^{2+} 'nın Etkisinin Sonuçları

<i>P. fragi</i> Serbest PL					
Metal İyonları	Konsantrasyon (mM)	Bağlı Aktivite (%)	Konsantrasyon (mM)	Bağlı Aktivite (%)	
Kontrol	-	100	-	100	
Cu^{2+}	1	5,67	5	41,17	
Hg_2^{2+}	1	46,67	5	0	
Ca^{2+}	1	150	5	129,41	
Mg^{2+}	1	86,67	5	0	
Zn^{2+}	1	130	5	129,41	
Fe^{2+}	1	16,67	5	5,88	
<i>P. fragi</i> Hibrit PL					
Metal İyonları	Konsantrasyon (mM)	Bağlı Aktivite (%)	Konsantrasyon (mM)	Bağlı Aktivite (%)	
Kontrol	-	100	-	100	
Cu^{2+}	1	1,01	5	73,07	
Hg_2^{2+}	1	56,57	5	0	
Ca^{2+}	1	111,11	5	230,76	
Mg^{2+}	1	97,98	5	123,08	
Zn^{2+}	1	142,42	5	203,84	
Fe^{2+}	1	208,08	5	196,15	

Tablo 14. *A. pallidus*'dan Üretilip Saflaştırılan Pektin Liyaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} ve Hg_2^{2+} 'nın Etkisinin Sonuçları

<i>A. pallidus</i> Serbest PL					
Metal İyonları	Konsantrasyon (mM)	Bağlı Aktivite (%)	Konsantrasyon (mM)	Bağlı Aktivite (%)	
Kontrol	-	100	-	100	
Cu^{2+}	1	78,68	5	126,25	
Hg_2^{2+}	1	0	5	0	
Ca^{2+}	1	57,38	5	31,25	
Mg^{2+}	1	75,41	5	12,5	
Zn^{2+}	1	57,38	5	30	
Fe^{2+}	1	73,77	5	47,5	
<i>A. pallidus</i> Hibrit PL					
Metal İyonları	Konsantrasyon (mM)	Bağlı Aktivite (%)	Konsantrasyon (mM)	Bağlı Aktivite (%)	
Kontrol	-	100	-	100	
Cu^{2+}	1	81,18	5	0	
Hg_2^{2+}	1	24,75	5	0	
Ca^{2+}	1	100	5	100	
Mg^{2+}	1	145,54	5	83,33	
Zn^{2+}	1	167,33	5	59,52	
Fe^{2+}	1	124,75	5	76,19	

L. plantarum bakterisinden üretilerek saflaştırılan serbest PL enzimi Tablo 12'da elde edilen verilere göre 1 mM Hg_2^{2+} %83 oranında inhibe ederken Ca^{2+} %11,1 aktive etti. 5 mM Zn^{2+} %25 kısmen aktive etti. Hibrit PL enzimi ise 1 mM konsantrasyonunda Ca^{2+} %31,67, Mg^{2+} %76,67, Zn^{2+} %73,33 ve Fe^{2+} ise %76,67 oranında aktive etti. 1mM Cu^{2+} hibrit PL enzimini inhibe ederken 5 mM Cu^{2+} %8,33 oranında kısmen aktive etti. 5 mM konsantrasyonunda Ca^{2+} %137,5, Zn^{2+} %195,8 ve Fe^{2+} %100 aktive ettiği belirlendi.

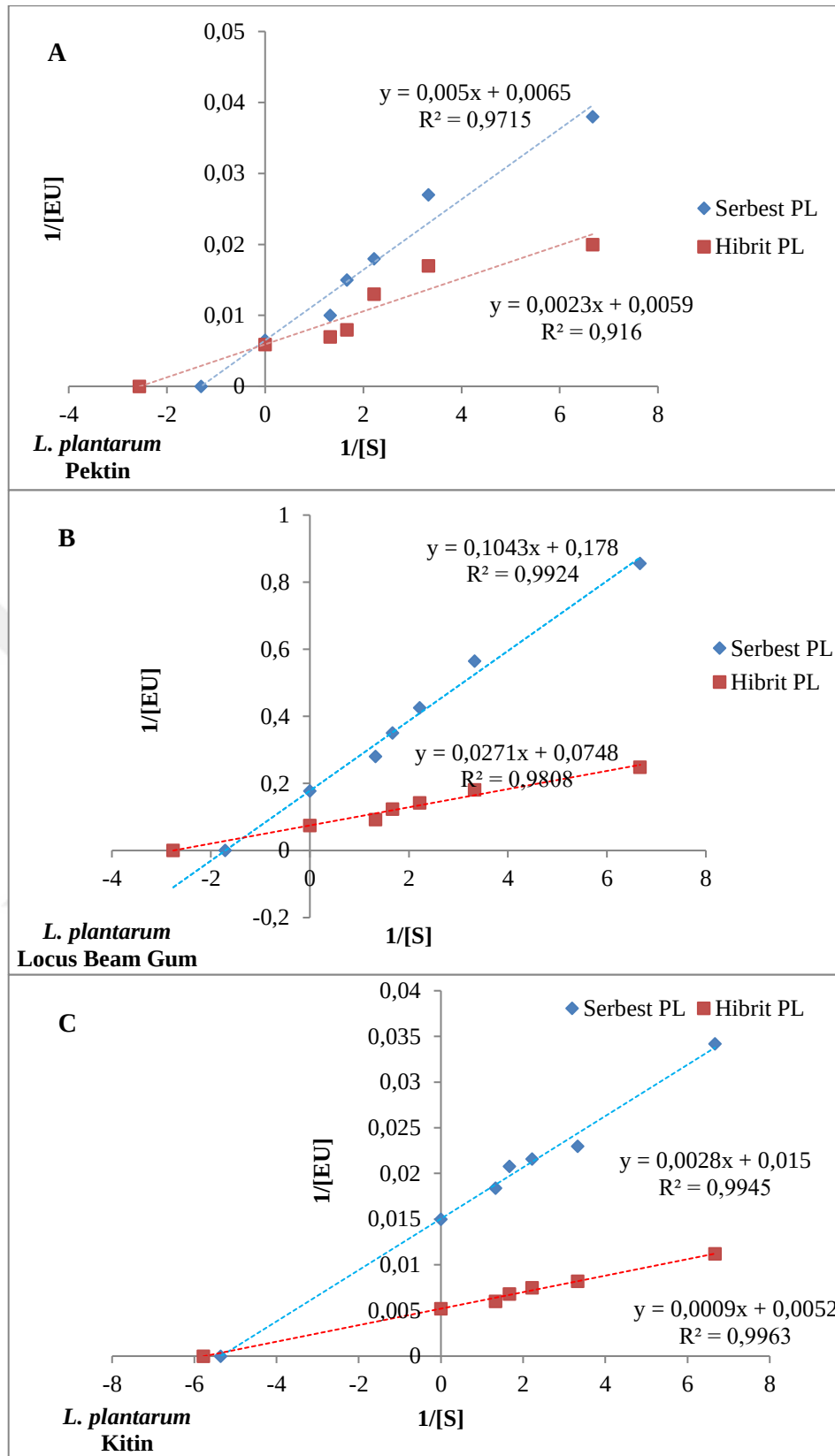
P. fragi bakterisinden üretilerek saflaştırılan serbest PL enzimi Tablo 13'da elde edilen verilere göre 1 mM konsantrasyonunda Ca^{2+} %50, Zn^{2+} %30 oranında aktive ederken 1 mM Hg_2^{2+} %46,67 ve Fe^{2+} %16,67 oranında kısmen inhibe etti. 5 mM konsantrasyonunda Ca^{2+} %29,41, Zn^{2+} %29,41 oranında aktive etti. 5 mM Cu^{2+} %41 ve Fe^{2+} %5,88 oranında kısmen inhibe etti. Hibrit PL enzimi ise 1 mM Ca^{2+} %11,11, Zn^{2+} %42,42 ve Fe^{2+} %108,8 oranında aktive etti. 1 mM Hg_2^{2+} %43,43, Mg^{2+} %2,02 oranında kısmen inhibe etti. 5 mM Ca^{2+}

%130,76, Mg^{2+} %23,06 Zn^{2+} %103,84 Fe^{2+} %96,15 oranında aktive etti. Cu^{2+} iyonu ise %26,93 oranında kısmen inhibe ettiği belirlendi.

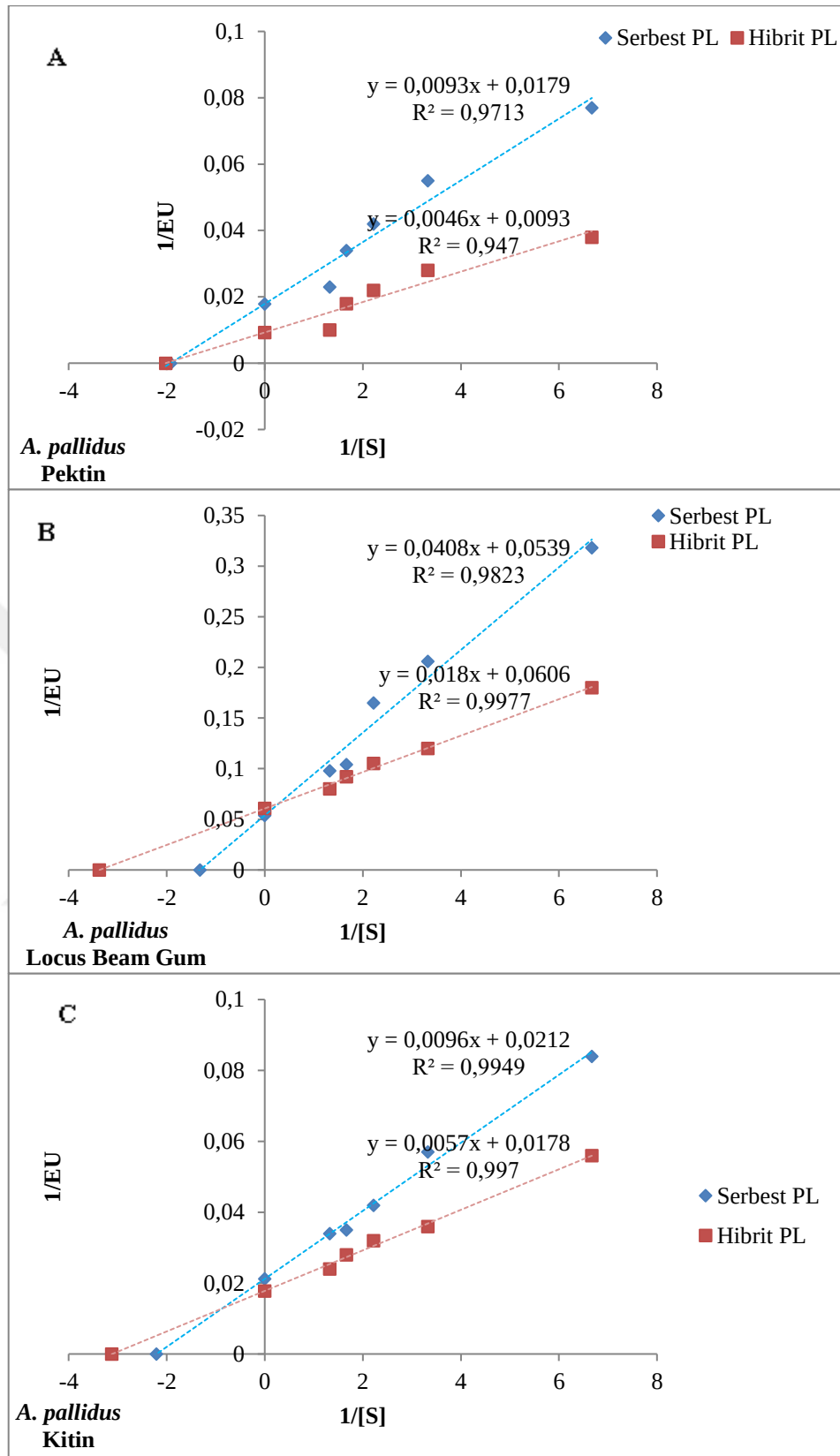
A. pallidus bakterisinden üretilerek saflaştırılan serbest PL enzimi Tablo 14’de elde edilen verilere göre 1 mM konsantrasyonunda Hg_2^{2+} tamamen inhibe ederken 1mM Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} kısmen inhibe etti. 5 mM Cu^{2+} %26,25 oranında aktive ederken Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Hg_2^{2+} kısmen inhibe etti. Hibrit PL enzimi ise 1 mM Mg^{2+} iyonu %45,54, Zn^{2+} %67,33 ve Fe^{2+} %24,75 oranında aktive ederken 1 mM Ca^{2+} etki etmedi. 5 mM Cu^{2+} ve Hg_2^{2+} tamamen inhibe ederek Mg^{2+} %16,67, Zn^{2+} %40,48 ve Fe^{2+} %23,81 oranında kısmen inhibe ettiği belirlendi.

Saflaştırılan Serbest ve Hibrit Pektin Liyaz Enziminin V_{max} ve K_m Değerlerinin Belirlenmesi

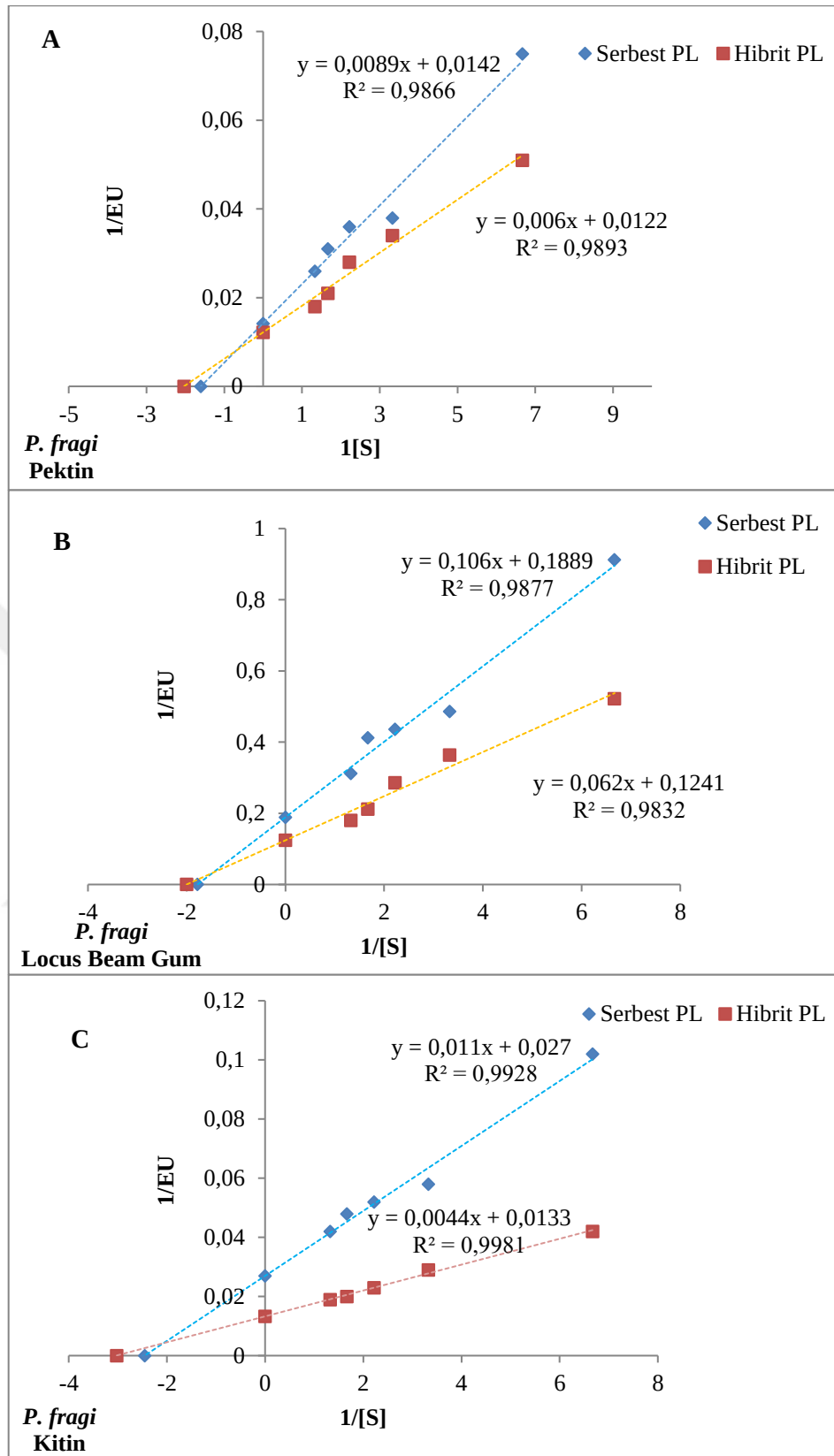
Serbest ve hibrit pektin liyaz enziminin maksimum hız (V_{max}) ve hız sabitini (K_m) belirlemek için %1,5’lik pektin, locus beam gum ve kitin substratları kullanılarak optimum aktivite tayini yapıldı. Beş farklı substrat konsantrasyonunda pektin liyaz aktiviteleri ölçüldü ve $1/V$ ’ye karşı $1/S$ Linewear-Burk grafiği çizildi (Şekil 42-44.). Çizilen Linewear-Burk grafiklerinden yararlanılarak V_{max} ve K_m değerleri hesaplandı ve substrat spesifikliği belirlendi (Tablo 15).



Şekil 42. *L. plantarum* bakterisinde üretilerek ÜFA metodu ile saflaştırılan serbest ve hibrit PL enziminin (A) pektin, (B) locus beam gum ve (C) kitin substratlarına ait Lineweaver-Burk grafikleri



Şekil 43. *A. pallidus* bakterisinde üretilerek ÜFA metodu ile saflaştırılan serbest ve hibrit PL enziminin (A) pektin, (B) locus beam gum ve (C) kitin substratlarına ait Lineweaver-Burk grafikleri



Şekil 44. *P. fragi* bakterisinde üretilerek ÜFA metodu ile saflaştırılan serbest ve hibrit PL enziminin (A) pektin, (B) locus beam gum ve (C) kitin substratlarına ait Lineweaver-Burk grafikleri

Tablo 15. *L. plantarum* Bakterisinde Üretilerek Üfa Metodu İle Saflaştırılan Serbest ve Hibrit PL Enziminin Pektin, Locus Beam Gum ve Kitin Substratlarına ait V_{max} ve K_m Sonuçları

<i>L. plantarum</i>	Serbest PL		Hibrit PL	
	V_{max} ($\mu\text{mol/Ldak}$)	K_m (mg/mL)	V_{max} ($\mu\text{mol/Ldak}$)	K_m (mg/mL)
Pektin	153,85	0,77	169,5	0,39
Locus Beam Gum	5,62	0,58	13,37	0,36
Kitin	66,67	0,19	192,31	0,17

Tablo 16. *A. pallidus* Bakterisinde Üretilerek ÜFA Metodu İle Saflaştırılan Serbest ve Hibrit PL Enziminin Pektin, Locus Beam Gum ve Kitin Substratlarına ait V_{max} ve K_m Sonuçları

<i>A. pallidus</i>	Serbest PL		Hibrit PL	
	V_{max} ($\mu\text{mol/Ldak}$)	K_m (mg/mL)	V_{max} ($\mu\text{mol/Ldak}$)	K_m (mg/mL)
Pektin	55,87	0,52	107,53	0,5
Locus Beam Gum	18,55	0,76	16,47	0,3
Kitin	47,17	0,45	56,18	0,32

Tablo 17. *P. fragi* Bakterisinde Üretilerek ÜFA Metodu İle Saflaştırılan Serbest ve Hibrit PL Enziminin Pektin, Locus Beam Gum ve kitin Substratlarına ait V_{max} ve K_m Sonuçları

<i>P. fragi</i>	Serbest PL		Hibrit PL	
	V_{max} ($\mu\text{mol/Ldak}$)	K_m (mg/mL)	V_{max} ($\mu\text{mol/Ldak}$)	K_m (mg/mL)
Pektin	70,42	0,63	81,97	0,49
Locust Beam Gum	5,29	0,56	8,06	0,5
Kitin	37,03	0,41	75,19	0,33

L. plantarum bakterisinden üretilerek ÜFA metodu ile saflaştırılan hibrit PL enzimi pektin, locust beam gum ve kitin substratlarına karşı serbest PL enzime kıyasla daha yüksek aktivite gösterdiği belirlendi. Serbest PL enziminin pektin, locust bean gum ve kitin substratı için V_{max} değerleri sırasıyla 153,85 $\mu\text{mol/Ldk}$, 5,62 $\mu\text{mol/Ldk}$, 66,67 $\mu\text{mol/Ldk}$ olarak hesaplandı. Hibrit PL enziminin ise pektin, locust beam gum ve kitin substratlarına karşı V_{max} değerleri sırasıyla 169,5 $\mu\text{mol/Ldk}$, 13,37 $\mu\text{mol/Ldk}$ ve 192,31 $\mu\text{mol/Ldk}$ olarak hesaplandı. Serbest PL enziminin pektin, locust bean gum ve kitin substratı ile K_m değerleri sırasıyla 0,77 mg/mL, 0,58 mg/mL, 0,19 mg/mL olarak hesaplandı. Hibrit PL enziminin ise pektin, locust beam gum ve kitin substratlarına karşı K_m değerleri ise sırasıyla 0,39 mg/mL, 0,36 mg/mL ve 0,17 mg/mL olarak hesaplandı. Hesaplanan veriler Tablo 15’da verildi.

A. pallidus bakterisinden üretilerek ÜFA metodu ile saflaştırılan hibrit PL enzimi pektin, locust bean gum ve kitin substratlarına karşı serbest PL enzime kıyasla daha yüksek aktivite gösterdiği belirlendi. Serbest PL enziminin pektin, locust bean gum ve kitin substratı ile V_{max} değerleri sırasıyla 55,87 $\mu\text{mol/Ldk}$, 18,55 $\mu\text{mol/Ldk}$, 47,17 $\mu\text{mol/Ldk}$ olarak hesaplandı. Hibrit PL enziminin ise pektin, locust bean gum ve kitin substratlarına karşı V_{max} değerleri sırasıyla 107,53 $\mu\text{mol/Ldk}$, 16,47 $\mu\text{mol/Ldk}$ ve 56,18 $\mu\text{mol/Ldk}$ olarak hesaplandı. Serbest PL enziminin pektin, locust bean gum ve kitin substratı ile K_m değerleri sırasıyla 0,52 mg/mL, 0,76 mg/mL, 0,45 mg/mL olarak hesaplandı. Hibrit PL enziminin ise pektin, locust bean gum ve kitin substratlarına karşı K_m değerleri sırasıyla 0,5 mg/mL, 0,3 mg/mL ve 0,32 mg/mL olarak hesaplandı. Hesaplanan veriler Tablo 16’de verildi.

P. fragi bakterisinden üretilerek ÜFA metodu ile saflaştırılan hibrit PL enzimi pektin, locust bean gum ve kitin substratlarına karşı serbest PL enzime kıyasla daha yüksek aktivite gösterdiği belirlendi. Serbest PL enziminin pektin, locust bean gum ve kitin substratı ile V_{max} değerleri sırasıyla 70,42 $\mu\text{mol/Ldk}$, 5,29 $\mu\text{mol/Ldk}$, 37,03 $\mu\text{mol/Ldk}$ olarak hesaplandı. Hibrit PL enziminin ise pektin, locust bean gum ve kitin substratlarına karşı V_{max} değerleri sırasıyla 81,97 $\mu\text{mol/Ldk}$, 8,06 $\mu\text{mol/Ldk}$ ve 75,19 $\mu\text{mol/Ldk}$ olarak hesaplandı. Serbest PL enziminin pektin, locust bean gum ve kitin substratı ile K_m değerleri ise sırasıyla 0,63 mg/mL, 0,56 mg/mL, 0,41 mg/mL olarak hesaplandı. Hibrit PL enziminin ise pektin, locust bean gum ve kitin substratlarına karşı K_m değerleri sırasıyla 0,49 mg/mL, 0,5 mg/mL ve 0,33 mg/mL olarak hesaplandı. Hesaplanan veriler Tablo 17’de verildi.

Saflaştırılan Serbest ve Hibrit Nanoçiçek Pektin Liyaz İzoenzimlerinin Meyve Suyu Üretim Prosesi Sonuçları

L. plantarum, *A. pallidus* ve *P. fragi*’den üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan serbest ve hibrit nanoçiçek pektin liyaz enziminin meyve suyu üretim prosesinde parçalanma oranı ve meyve suyu berraklığı çalışıldı. Kontrol grubu olarak saf su kullanıldı.

Meyve suyu elde etme sürecinde yerel marketten temin edilen çilek, dağ çileği, siyah üzüm, nar, portakal, elma ve vişne püre haline getirilerek meyve suyu hazırlandı. 100 g meyve ile hazırlanan püre süzildükten sonra kuru madde tayini kontrol grubu ile kıyaslama yapılarak % parçalanma oranı Tablo 18-20’te verildi. Süzülen meyve suyu hacmi kontrol grubu ile kıyaslanarak % verim hesaplandı ve sonuçlar Tablo 21-23’de verildi. Süzülen tüm meyve sularında 660 nm’de optik dansisite ölçümü yapılarak % azalma sonuçları Tablo 24-26’de verildi.

L. plantarum’dan üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan serbest ve hibrit nanoçiçek pektin liyaz enzimi ile muamele edilen çilek, dağ çileği, siyah üzüm, nar,

portakal, elma ve vişne pürelerinden meyve suyu üretim prosesinde parçalanma oranı, verimi ve meyve suyu berraklığı saf su kullanılan kontrol grubuna göre parçalanma oranı en fazla serbest ve hibrit PL ile muamele edilen elma suyunda %23 ve %31,03 olarak hesaplandı. %Verim ise en fazla nar meyvesinde serbest ve hibrit PL enzimi kullanılan meyve pürelerinde sırasıyla %45,45 ve %81,81 olarak hesaplandı. 660 nm’de optik dansisite ölçümünde serbest ve hibrit PL ile muamele edilen portakal meyvesinde sırası ile (%27,6 ve %80,8) ve elma meyvesinde sırası ile (%9,01 ve %91,34) azalma tespit edildi.

A. pallidus’dan üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan serbest ve hibrit nanoçiçek pektin liyaz enzimi ile muamele edilen çilek, dağ çileği, siyah üzüm, nar, portakal, elma ve vişne pürelerinden meyve suyu üretim prosesinde parçalanma oranı, verimi ve meyve suyu berraklığı saf su kullanılan kontrol grubuna göre parçalanma oranı en fazla serbest ve hibrit PL ile muamele edilen vişne suyunda %16,04 ve %76,38 olarak hesaplandı. Verim ise en fazla portakal meyvesinde serbest ve hibrit PL enzimi kullanılan meyve pürelerinde sırasıyla %15,38 ve %23,08 olarak hesaplandı. 660 nm’de optik dansisite ölçümünde serbest ve hibrit PL ile muamele edilen elma meyvesinde sırası ile %62,04 ve %86,21 azalma tespit edildi.

P. fragi’den üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan serbest ve hibrit nanoçiçek pektin liyaz enzimi ile muamele edilen çilek, dağ çileği, siyah üzüm, nar, portakal, elma ve vişne pürelerinden meyve suyu üretim prosesinde parçalanma oranı, verimi ve meyve suyu berraklığı saf su kullanılan kontrol grubuna göre parçalanma oranı en fazla serbest ve hibrit PL ile muamele edilen dağ çileği meyve suyunda %43,4 ve %48,67 olarak hesaplandı. Verim ise en fazla çilek meyvesinde serbest ve hibrit PL enzimi kullanılan meyve pürelerinde sırasıyla %23,07 ve %38,46 olarak hesaplandı. 660 nm’de optik dansisite ölçümünde serbest ve hibrit PL ile muamele edilen elma meyvesinde sırası ile %4,46 ve %94,23 azalma tespit edildi.

Tablo 18. *L. plantarum* Bakterisinden Elde Edilen Serbest ve Hibrit PL Enzimi Eklenen Meyve Suyu Durultma Deneylerindeki Meyve Pürelerinin Kuru Madde Tayini Sonuçları

Meyve (100 g)		Kontrol	Serbest PL	Hibrit PL
Üzüm	KM (g)	2,36	1,82	1,74
	Azalma %	-	22,9	26,3
Elma	KM (g)	1,74	1,34	1,2
	Azalma %	-	23	31,03
Çilek	KM (g)	1,9	1,78	1,62
	Azalma %	-	6,32	14,74
Dağ Çileği	KM (g)	1,419	1,366	1,358
	Azalma %	-	3,74	4,30
Portakal	KM (g)	1,85	1,76	1,58
	Azalma %	-	4,86	14,6
Vişne	KM (g)	1,92	1,85	1,74
	Azalma %	-	3,65	9,38
Nar	KM (g)	2,04	1,95	1,8
	Azalma %	-	4,41	11,76

Tablo 19. *A. pallidus* Bakterisinden Elde Edilen Serbest ve Hibrit PL Enzimi Eklenen Meyve Suyu Durultma Deneylerindeki Meyve Pürelerinin Kuru Madde Tayini Sonuçları

Meyve (100 g)		Kontrol	Serbest PL	Hibrit PL
Üzüm	KM (g)	2,52	2,44	1,84
	Azalma %	-	3,17	26,98
Elma	KM (g)	0,265	0,236	0,207
	Azalma %	-	11,04	21,89
Çilek	KM (g)	0,181	0,161	0,139
	Azalma %	-	11,05	23,2
Dağ Çileği	KM (g)	1,851	1,559	1,012
	Azalma %	-	15,78	45,33
Portakal	KM (g)	0,385	0,376	0,204
	Azalma %	-	2,34	47
Vişne	KM (g)	0,268	0,225	0,063
	Azalma %	-	16,04	76,38
Nar	KM (g)	0,304	0,264	0,22
	Azalma %	-	13,16	27,63

Tablo 20. *P. fragi* Bakterisinden Elde Edilen Serbest ve Hibrit PL Enzimi Eklenen Meyve Suyu Durultma Deneylerindeki Meyve Pürelerinin Kuru Madde Tayini Sonuçları

Meyve (100 g)		Kontrol	Serbest PL	Hibrit PL
Üzüm	KM (g)	2,22	2,09	1,92
	Azalma %	-	5,86	13,51
Elma	KM (g)	1,51	1,39	1,33
	Azalma %	-	7,95	11,92
Çilek	KM (g)	2,02	1,84	1,39
	Azalma %	-	8,91	31,18
Dağ Çileği	KM (g)	1,956	1,107	1,004
	Azalma %	-	43,4	48,67
Portakal	KM (g)	2,39	2,3	2,24
	Azalma %	-	3,76	6,28
Vişne	KM (g)	0,66	0,59	0,34
	Azalma %	-	10,6	48,48
Nar	KM (g)	3,86	3,78	3,41
	Azalma %	-	2,07	11,65

Tablo 21. *L. plantarum* Bakterisinden Üretilen ve Üçlü Faz Ayırma Metoduna Göre Safılaştırılan Serbest ve Hibrit PL Enzimi Etkisiyle Edilen Meyve Suyu Miktarının Kontrole Göre Artış Oranı

Meyve (100 g)		Kontrol	Serbest PL	Hibrit PL
Üzüm	Hacim (mL)	100	105	110
	Verim %	-	5	10
Elma	Hacim (mL)	70	80	105
	Verim %	-	14,29	50
Çilek	Hacim (mL)	84	85	89
	Verim %	-	1,19	5,95
Dağ Çileği	Hacim (mL)	50	52	60
	Verim %	-	4	20
Portakal	Hacim (mL)	95	100	110
	Verim %	-	5,26	15,79
Vişne	Hacim (mL)	57	62	67
	Verim %	-	8,77	17,54
Nar	Hacim (mL)	55	80	100
	Verim %	-	45,45	81,81

Tablo 22. *A. pallidus* Bakterisinden Üretilen ve Üçlü Faz Ayırma Metoduna Göre Saflaştırılan Serbest ve Hibrit PL Enzimi Etkisiyle Edilen Meyve Suyu Miktarının Kontrole Göre Artış Oranı

Meyve (100 g)		Kontrol	Serbest PL	Hibrit PL
Üzüm	Hacim (mL)	90	100	105
	Verim %	-	11,11	16,67
Elma	Hacim (mL)	95	100	105
	Verim %	-	5,26	10,53
Çilek	Hacim (mL)	85	87	95
	Verim %	-	2,35	11,76
Dağ Çileği	Hacim (mL)	55	60	63
	Verim %	-	9,1	14,55
Portakal	Hacim (mL)	65	75	80
	Verim %	-	15,38	23,08
Vişne	Hacim (mL)	90	95	100
	Verim %	-	5,56	11,11
Nar	Hacim (mL)	95	100	102
	Verim %	-	5,26	7,37

Tablo 23. *P. fragi* Bakterisinden Üretilen ve Üçlü Faz Ayırma Metoduna Göre Saflaştırılan Serbest ve Hibrit PL Enzimi Etkisiyle Edilen Meyve Suyu Miktarının Kontrole Göre Artış Oranı

Meyve (100 g)		Kontrol	Serbest PL	Hibrit PL
Üzüm	Hacim (mL)	100	105	110
	Verim %	-	5	10
Elma	Hacim (mL)	98	100	105
	Verim %	-	2,04	7,14
Çilek	Hacim (mL)	65	80	90
	Verim %	-	23,07	38,46
Dağ Çileği	Hacim (mL)	45	50	55
	Verim %	-	11,11	22,22
Portakal	Hacim (mL)	80	85	92
	Verim %	-	6,25	15
Vişne	Hacim (mL)	90	95	100
	Verim %	-	5,56	11,11
Nar	Hacim (mL)	90	100	105
	Verim %	-	11,11	16,67

Tablo 24. *L. plantarum* Bakterisinden Üretilen ve Üçlü Faz Ayırma Metoduna Göre Saflaştırılan Serbest ve Hibrit PL Enzimi Eklenen Meyve Pürelerinden Elde Edilen Meyve Suyu Optik Dansitedeki 660 nm Absorbansdaki % Berraklaşma Oranları

Meyve	660 nm Absorbansda % Berraklaşma Oranı		
	Kontrol	Serbest PL (%)	Hibrit PL (%)
Üzüm	100	12,84	17,57
Elma	100	9,01	91,34
Çilek	100	6,06	31,81
Dağ çileği	100	14,65	72,27
Portakal	100	27,26	80,78
Vişne	100	8,04	27,84
Nar	100	2	20,2

Tablo 25. *A. pallidus* Bakterisinden Üretilen ve Üçlü Faz Ayırma Metoduna Göre Saflaştırılan Serbest ve Hibrit PL Enzimi Eklenen Meyve Pürelerinden Elde Edilen Meyve Suyu Optik Dansitedeki 660 nm Absorbansdaki % Berraklaşma Oranları

Meyve	660 nm Absorbansda % Berraklaşma Oranı		
	Kontrol	Serbest PL (%)	Hibrit PL (%)
Üzüm	100	1,58	9,13
Elma	100	62,04	86,21
Çilek	100	5,21	84,17
Dağ çileği	100	9,7	48,76
Portakal	100	24,07	35,62
Vişne	100	2,78	4,07
Nar	100	10,32	18,94

Tablo 26. *P. fragi* Bakterisinden Üretilen ve Üçlü Faz Ayırma Metoduna Göre Saflaştırılan Serbest ve Hibrit PL Enzimi Eklenen Meyve Pürelerinden Elde Edilen Meyve Suyu Optik Dansitedeki 660 nm Absorbansdaki % Berraklaşma Oranları

Meyve	660 nm Absorbansda % Berraklaşma oranı		
	Kontrol	Serbest PL	Hibrit PL
Üzüm	100	28,45	69,48
Elma	100	4,46	94,23
Çilek	100	5,91	19,58
Dağ çileği	100	19,36	20,97
Portakal	100	5,91	89,84
Vişne	100	6,93	28,52
Nar	100	17,72	2,97

TARTIŞMA ve SONUÇ

Tartışma

Yaptığımız bu tez çalışmasında PL enzim aktivitesine sahip farklı mikroorganizmalar incelendi. Araştırmalar sonucunda yüksek PL enzim aktivitesi gösteren *Lactobacillus plantarum*, *Aeribacillus pallidus* ve *Pseudomonas fragi* olmak üzere 3 farklı bakteri suşu bulundu. PL enzim aktivitesi gösteren bu 3 bakterinin katı kültür fermentasyon ortamında ürettikleri PL enzimi üçlü faz ayırma metodu ile saflaştırılarak serbest ve hibrit nanoçiçek yapısının sentezi, karakterizasyonu ve hibrit yapısının meyve suyu endüstrisindeki kullanımı araştırıldı.

Lactobacillus plantarum'dan üretilen ÜFA metoduna göre saflaştırdığımız PL enziminde çözücü olarak n-bütanol ve tuz olarak amonyum sülfat optimizasyonu yapıldı. Elde ettiğimiz aktivite sonuçlarına göre 1:0,5 oranında (ekstrakt:n-bütanol) ve %60 amonyum sülfat konsantrasyonunda optimum PL enzim aktivite değeri belirlendi. ÜFA metoduna göre saflaştırılan PL enzimi %81,5 verim ve 74,8 kat olarak saflaştırıldı.

Aeribacillus pallidus'dan üretilen ÜFA metoduna göre saflaştırdığımız PL enziminde çözücü olarak n-bütanol ve tuz olarak amonyum sülfat optimizasyonu yapıldı. Elde ettiğimiz aktivite sonuçlarına göre 1:1 oranında (ekstrakt:n-bütanol) ve %70 amonyum sülfat konsantrasyonunda optimum PL enzim aktivite değeri belirlendi. ÜFA metoduna göre saflaştırılan PL enzimi %82 verim ve 158,71 kat olarak saflaştırıldı.

Pseudomonas fragi'den üretilen ÜFA metoduna göre saflaştırdığımız PL enziminde çözücü olarak n-bütanol ve tuz olarak amonyum sülfat optimizasyonu yapıldı. Elde ettiğimiz aktivite sonuçlarına göre 1:1 oranında (ekstrakt:n-bütanol) ve %40 amonyum sülfat konsantrasyonunda optimum PL enzim aktivite değeri belirlendi. ÜFA metoduna göre saflaştırılan PL enzimi %78,1 verim ve 63,9 kat olarak saflaştırıldı.

Irshad *et al.*, 2017 yılında yaptıkları bir çalışmada *Aspergillus ornatus*'tan izole edilerek Poligalakturonaz (PG), pektin liyaz (PL) ve pektin metilesteraz (PME) dahil olmak üzere pektinolitik enzimleri istatistiksel olarak optimize etmiş ve amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve Sephadex G100 jel permeasyon kromatografisiyle saflaştırmışlardır. Sephadex G-100 kolonundan geçtikten sonra, PL 3.30 kat ve 557.1 U/mg spesifik aktiviteleri ile saflaştırmışlardır. Demir ve arkadaşları (2014) yaptıkları bir çalışmada *Brevibacillus*

borstelensis P35 tarafından salgılanan bir alkalın pektin liyaz (PL) (EC 4.2.2.10), amonyum sülfat fraksiyonu, DEAE-selüloz anyon değişim kromatografisi ve Sephadex G-150 jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak 30,9 kat saflaştırmışlardır. Nadaroğlu *et al.*, 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada hücre dışı pektin liyaz katı hal fermentasyonunda *Bacillus pumilus* (P9) tarafından üretilmiş. Pektin liyaz enzimi, DEAE-selüloz anyon değişim kolon kromatografisi kullanılarak 36,36 kat saflaştırmışlar ve karakterize etmişlerdir.

L. plantarum, *A. pallidus* ve *P. fragi*'den üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan pektin liyaz enziminin alt birim sayısı ve molekül ağırlığı SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile gösterildi. SDS poliakrilamid jel elektroforezi sonucunda *L. plantarum*'dan saflaştırılan pektin liyaz enzimi 39 kDa, *A. pallidus*'dan saflaştırılan pektin liyaz enzimi 18 kDa, *P. fragi*'den saflaştırılan pektin liyaz enzimi 65 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu belirlendi.

elik ve ark., 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırdıkları PL enziminin SDS-PAGE poliakrilamid jel elektroforezi ile molekül ağırlığı 67 kDa olarak bulmuşlardır. Yapılan farklı bir çalışmada, *Penicillium purpurogenum*'dan saflaştırılan ve karakterize edilen pektin liyaz enziminin SDS-PAGE jel elektroforez yöntemi ile 45 kDa moleküler ağırlığına sahip olduğu belirlenmiştir (Perez-Fuentes, 2014). Nadaroglu *et al.*, 2010 yılında yaptıkları farklı bir çalışmada *B. pumilus* (P9) bakterisinden katı kültür fermentasyon yöntemi ile ekstraselüler olarak üretilen pektin liyaz enziminin DEAE-selüloz anyon deęiőtirme kolon kromatografisi ile saflaştırılması sonucunda SDS-PAGE yöntemi ile 25 kDa molekül ağırlığına sahip olduğunu belirlemişlerdir.

L. plantarum bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısının taramalı elektron mikroskobu (SEM) karakterizasyonuna ait görüntüleri incelendiğinde hibrit nanoçiçek yapısının pH 5'te olduğu görüldü. EDX spektroskopisinde hibrit nanoçiçek PL yapısında Ca (%17,2), N (%3), O (%50) ve P (%15,6) oranında elementleri içermektedir. P atomunun Ca atomuna oranı 1,172 olarak hesaplandı.

A. pallidus bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısının taramalı elektron mikroskobu (SEM) karakterizasyonuna ait görüntüleri incelendiğinde hibrit nanoçiçek yapısının pH 5'te olduğu görüldü. EDX spektroskopisinde hibrit nanoçiçek PL yapısında Ca (%16,9), O (%45) ve P (%16,4) oranında elementleri içermektedir. P atomunun Ca atomuna oranı 1,263 olarak hesaplandı.

P. fragi bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısının taramalı elektron mikroskobu (SEM) karakterizasyonuna ait görüntüleri incelendiğinde hibrit nanoçiçek yapısının pH 5'te olduğu görüldü. . EDX spektroskopisinde hibrit nanoçiçek PL

yapısında Ca (%12,3), N (%6,8), O (%48,4) ve P (%14,1) oranında elementleri içermektedir. P atomunun Ca atomuna oranı 1,49 olarak hesaplandı.

Wang ve arkadaşları katalaz enzimi ile kitosan-tripolifosfat nanoçiçekleri iyonotropik jelasyon yöntemi ile sentezlemişlerdir. Nanoçiçeklerin SEM-EDX analizinde C, P, O ve Ca elementlerinin oluştuğunu görmüşlerdir. P atomunun Ca atomuna oranı 1,448 olarak hesaplamışlardır. TEM görüntülerinde ise plaka şekilli parçacıklardan meydana gelen hiyerarşik mikro gözenekli yapılar olduğu anlaşılmıştır (Wang *et al.*, 2014)

B. pumilus'dan üretilerek hibrit nanoçiçek PL yapısının SEM görüntülerinde hibrit nanoçiçek PL yapısının pH 10'da oluştuğunu belirlemiştir. EDX hibrit nanoçiçek PL yapılarının O %48,2, P %18,6, Ca %16,1 ve Na %6,1 elementlerini içerdiği belirlemiştir. P atomunun Ca atomuna oranını 1,483 olarak hesaplamıştır (Babagil, 2018).

B. licheniformis'den üretilerek hibrit nanoçiçek PL yapısının SEM görüntülerinde hibrit nanoçiçek PL yapısının pH 10'da oluştuğunu belirlemiştir. EDX hibrit nanoçiçek PL yapılarının O %39,2, P %22,9, Ca %22,1 ve Na %4,4 elementlerini içerdiği belirlemiştir. P atomunun Ca atomuna oranını 1,348 olarak hesaplamıştır (Babagil, 2018).

L. plantarum bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısına ait XRD grafiğine göre 7,03°, 14,59°, 18,66°, 20,71°, 28,09° ve 30,46°'lerde pikler elde edildi. *A. pallidus* bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısına ait XRD grafiğine göre 7,03°, 14,6°, 18,66°, 28,14°, 30,72° ve 33,45°'lerde pikler elde edildi. *P. fragi* bakterisinden üretilerek saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısına ait XRD grafiğine göre 7,06°, 13,94°, 18,72°, 20,97°, 29,22°, 30,43° ve 31,22°'lerde pikler elde edildi. *L. plantarum*, *A. pallidus* ve *P. fragi* bakterilerinden saflaştırılan hibrit PL enziminin grafikleri incelendiğinde nanoçiçeklerin organik pektin liyaz enzim bileşenine dağılmış $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ kristallerinden oluştuğunu ortaya koymaktadır.

Wang *et al.*, 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada nanoçiçeklerin faz ve kristal yapısını karakterize etmek için XRD kullanmışlardır. XRD analizi, mineralize mikroçiçeklerin kalsiyum pirofosfat hidrat (CPPD, $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, PDF#41-0490 ve $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, PDF#44-0762) olduğunu kanıtlamıştır. Geniş tepe noktaları nanoçiçeklerin kristal yapısına atfedilmiştir. Nanoçiçekler, SEM görüntülerinde gösterildiği gibi morfolojilerini iyi korumuş ve XRD analizinden kalsiyum pirofosfat olarak tanımlanmıştır.

L. plantarum'dan üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısının FT-IR spektrumu analiz sonuçları incelendiğinde 1660 cm^{-1} , 1232

cm^{-1} , 1166 cm^{-1} , 1091 cm^{-1} , 1004 cm^{-1} , 912 cm^{-1} , 767 cm^{-1} , 700 cm^{-1} , 594 cm^{-1} , 514 cm^{-1} 'de pikler görüldü.

A. pallidus 'dan üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısının FT-IR spektrumu analiz sonuçları incelendiğinde 1660 cm^{-1} , 1236 cm^{-1} , 1168 cm^{-1} , 1093 cm^{-1} , 991 cm^{-1} , 912 cm^{-1} , 765 cm^{-1} , 700 cm^{-1} , 615 cm^{-1} , 514 cm^{-1} 'de pikler görüldü.

P. fragi 'den üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan PL enziminin hibrit nanoçiçek yapısının FT-IR spektrumu analiz sonuçları incelendiğinde 1664 cm^{-1} , 1253 cm^{-1} , 1168 cm^{-1} , 1093 cm^{-1} , 995 cm^{-1} , 914 cm^{-1} , 756 cm^{-1} , 698 cm^{-1} , 615 cm^{-1} , 595 cm^{-1} , 538 cm^{-1} , 514 cm^{-1} 'de pikler görüldü.

L. plantarum, *A. pallidus* ve *P. fragi* bakterilerinden üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan pektin liyaz enziminin hibrit nanoçiçek yapısının FTIR analiz sonuçlarında 3440 ve 1649 cm^{-1} 'deki bantlar, sırasıyla su moleküllerinin gerilme ($\nu\text{O-H}$) ve eğilme (δHOH) titreşimlerini göstermektedir. 919 , 912 , 767 , 765 , 756 , 703 , 700 ve 698 cm^{-1} 'deki bantlar, $\text{P}_3\text{O}_{10}^{-5}$ ve $\text{P}_2\text{O}_7^{-4}$ 'ün kızılötesi spektrumu ile tutarlı olan vs POP simetrik titreşimlerinin karakteristiğidir. 756 ve 765 cm^{-1} 'deki bant, bir $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ trifosfat yapısı ile karakterize edildi. 536 cm^{-1} 'deki bant, fosfatların $\text{P}_3\text{O}_{10}^{-5}$ ve $\text{P}_2\text{O}_7^{-4}$ ile bükülme titreşimini gösterdi. FT-IR spektrumları, nanoçiçeklerde tripolifosfat ve kalsiyum pirofosfat hidratın varlığını doğruladı. Bu nedenle nanoçiçekler kitosan-tripolifosfat nanokompleksleri ve kalsiyum pirofosfat hidrat kristallerinin karışımı olarak tanımlandı. (Babagil, 2018; Ghebleh, 2017).

3440 ve 1649 cm^{-1} 'deki bantlar, sırasıyla su moleküllerinin gerilme ($\nu\text{O-H}$) ve eğilme (δHOH) titreşimlerine bağlandı. 906 , 758 ve 700 cm^{-1} 'deki bantlar, $\text{P}_3\text{O}_{10}^{-5}$ ve $\text{P}_2\text{O}_7^{-4}$ kızılötesi spektrumu ile tutarlı olan vs POP simetrik titreşimlerinin karakteristiği idi. 758 cm^{-1} 'deki bant, bir $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ trifosfat yapısı ile karakterize edildi. 536 cm^{-1} 'deki bant, fosfatların $\text{P}_3\text{O}_{10}^{-5}$ ve $\text{P}_2\text{O}_7^{-4}$ ile bükülme titreşimini gösterdi. FT-IR spektrumları, mikro çiçeklerde TPP ve CPPD'nin varlığını daha da doğruladı. Bu nedenle, mikro çiçekler, CS-TPP nanokompleksleri ve CPPD kristallerinin karışımı olarak tanımlandı (Wang *et al.*, 2015).

1042 'de (asimetrik gerilme), 988 'de (simetrik gerilme) ve 623 (bükülme) cm^{-1} 'de güçlü karakteristik absorpsiyon ortaya çıkarır, bunların tümü P-O titreşimlerine atfedilebilir; bu sinyaller fosfat gruplarının varlığını gösterir. Saf SBP'nin tipik absorpsiyon zirveleri, CONH için 1655 ve 1545 cm^{-1} 'de ve CH_2 ve CH_3 için 2800 - 3000 cm^{-1} 'de meydana geldi (Yu *et al.*, 2015).

L. plantarum ve *P. fragi*'den saflaştırılan PL enzimi için pH 5'de, *A. pallidus*'dan saflaştırılan PL enzimi için pH 9'da optimum aktivite görüldü. Hibrit PL enziminin daha kararlı yapıda ve aktif olduğu görüldü. *L. plantarum* ve *P. fragi*'den saflaştırılan PL enziminin hibrit yapısı için pH 8 ve *A. pallidus*'dan saflaştırılan PL enzimi hibrit yapısı için pH 9'da optimum aktivite görüldü. Elde edilen verilerden pH 4,0'ın altında ve pH 10,00'un üzerinde serbest ve hibrit PL enzimleri aktivite kaybı gösterdi.

Demir *et al.*, 2011 yılında yaptıkları bir çalışmada *Geobacillus stearothermophilus* Ah22'den üreterek saflaştırdıkları pektin liyaz enziminin optimum pH değerini 6 olarak bulmuşlardır. Fakat pH 5-10 arası aktif olduğunu belirtmişlerdir.

Brevibacillus borstelensis (P35) bakterisinden izole edip saflaştırılan PL enziminin optimum pH çalışmasında optimum pH değeri 8 olarak belirlenmiş ve pH 7-9 aralığında orijinal aktivitenin %50'sinden fazlasını koruduğunu belirlemişlerdir. Bu optimum pH değeri, daha önce *Pythium splendens*, *Penicillium oxalicum*, *Cystofilobasidium capitatum* ve *Erwinia aroideae*'den saflaştırılan PL aktivitesine benzer olduğunu görmüşlerdir (Demir *et al.*, 2014).

L. plantarum, *A. pallidus* ve *P. fragi*'den saflaştırdığımız pektin liyaz enziminin serbest ve hibrit pektin liyaz enziminin optimum sıcaklık değeri 10-90°C sıcaklık aralığında araştırıldı. Ölçülen aktivite değerlerine göre *L. plantarum* bakterisinden saflaştırılan serbest PL enzimi 60°C, *A. pallidus* ve *P. fragi*'den saflaştırılan serbest PL enzimi ise 50°C olduğu görüldü. *L. plantarum*, *A. pallidus* ve *P. fragi*'den bakterisinden saflaştırılan hibrit PL enzimi optimum sıcaklığı 40°C olarak ölçüldü.

Yadav *et al.*, 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada *Aspergillus flavus*'tan saflaştırdıkları pektin liyaz enziminin optimum pH 8.0 olarak hesaplamışlardır ve maksimum aktivitesinin %50'sini pH 6-9 aralığında gösterdiğini ifade etmişlerdir. pH 4-10 aralığında 24 saat boyunca bırakılarak pH stabilitesinin çoğunu koruduğunu görmüşlerdir. Enzimin optimum sıcaklığını 50 °C olarak bulmuşlardır. Enzim 1 saat boyunca sıcaklığa maruz bırakıldığında kalan aktivite yüzdesi enzimin 50 °C'ye kadar tam aktivitesini koruduğunu ve daha sonra sıcaklık artışı ile aktivitenin azaldığını ifade etmişlerdir.

Bacillus pumilus (P9)'dan saflaştırılan pektin liyaz enziminin sıcaklığın etkisi 0 °C ile 90 °C arasında 10 derecelik artışlarla araştırılmış ve optimum sıcaklık 60 °C olarak bulunmuştur. Enzim 20 °C ile 80 °C arasında aktiviteye sahiptir. Pektin liyazının optimum sıcaklığı, *Bacillus sp.* DT7'den elde edilen PL'lere benzer olduğunu ve *Rhizopus oryzae*, *Curvularia inaequalis* NRRL 13884, *Bacillus sp.* PN33'ten daha yüksek olduğunu ifade etmişlerdir (Nadaroglu *et al.*, 2010).

L. plantarum bakterisinden saflaştırılan PL enzimi serbest formda pH 5’de daha stabil ve 7 gün sonra ilk aktivitesinin %66,32 sini korurken hibrit yapıda ise pH 8’de daha stabil ve ilk aktivitesinin %90’ını koruduğu hesaplandı. *A. pallidus* bakterisinden saflaştırılan PL enzimi serbest formda pH 9’da daha stabil ve 7 gün sonra ilk aktivitesinin %60’ını korurken hibrit yapıda ise pH 9’de daha stabil ve ilk aktivitesinin %80,4’n koruduğu hesaplandı. *P. fragi* bakterisinden saflaştırılan PL enzimi serbest formda pH 5’de daha stabil ve 7 gün sonra ilk aktivitesinin %70,9’ını korurken hibrit yapıda ise pH 8’de daha stabil ve ilk aktivitesinin %80’ini koruduğu hesaplandı.

Babagil, 2018 yılında yaptığı bir çalışmada stabil pH değerini belirlemek için *S. sanguinis*, *B. pumilus* ve *B. licheniformis*’in serbest PL sonuçlarında pH 9 da en yüksek aktiviteye sahip olduğunu belirtmiştir. Hibrit PL enziminde ise pH 8 olarak en yüksek aktiviteye sahip olduğu ve 7 gün boyunca aktivitesini koruduğunu belirtmiştir.

L. plantarum, *A. pallidus* ve *P. fragi*’den saflaştırdığımız pektin liyaz enziminin serbest ve hibrit pektin liyaz enziminin stabil sıcaklık değeri 10-90 °C aralığında 2 saat boyunca belirlenen sıcaklık değerinde inkübe edilerek araştırıldı. Ölçülen aktivite değerlerine göre *L. plantarum* bakterisinden saflaştırılan serbest PL enzimi 40 °C ve hibrit PL enzimi 50 °C’de, *A. pallidus* bakterisinden saflaştırılan serbest PL enzimi 40 °C ve hibrit PL enzimi 60 °C’de ve *P. fragi*’den saflaştırılan serbest PL enzimi ise 30 °C ve 50 °C, hibrit PL enzimi ise 20 °C ve 30 °C’de daha stabil olduğu görüldü.

İncelenen tüm pH değerlerinde, immobilize enzimler serbest enzimden çok daha kararlı olduğunu ve pH 5’te immobilize edilen enzim en kararlı iken pH 8’de immobilize edilen enzim en az stabil immobilize biyokatalizör olduğunu ifade etmişlerdir. Örneğin, pH 4.8 ve 55 °C’de, pH 5’te immobilize edilen en stabil preparasyon, aktivitenin %80’den fazlasını koruduğunda ve pH 6.5 ve pH 8’de immobilize edilen enzim aktivitesinin yaklaşık %60’ını korurken serbest enzim tamamen inaktif olduğunu tespit etmişlerdir. pH 8 ve 35 °C’de inaktivasyonun inkübasyonun ilk dakikalarında serbest enzim aktivitesinde belirgin bir düşüş gösterdiği, pH 5’te immobilize edilen biyokatalizörün hala %30 aktivite gösterdiği, 5 saatlik inaktivasyondan sonra pH 6,5 (%23) ve pH 8 (%18)’de aktif olduğunu bulmuşlardır (Magro et al., 2020).

Rajdeo et al. 2016 yılında yaptıkları bir çalışmada elma suyunun berraklaştırılması için biyokatalizör olarak pektinaz kullanmışlardır. Çalışma süresini uzatmak termal olarak kararlı formu ve depolamayı uzatmak için sıcaklığın pektinaz aktivitesi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Enzimi pH 4,8 olan tamponda 6 saat süre ile 30°C ila 60°C arasında değişen sıcaklıklarda inkübe etmişler ve enzim aktivitesini test etmişlerdir. Hem serbest hem de

immobilize enzimlerin 40°C'ye kadar stabil olduğu ve 50°C'nin ötesinde hızla aktivite kaybettiği bulmuşlardır.

L. plantarum bakterisinden üretilerek ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan serbest PL enzim aktivitesi üzerine 1 mM Hg_2^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} ve Fe^{2+} , 5 mM Hg_2^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} ve Zn^{2+} metal iyonları aktive ederken Mg^{2+} ve Cu^{2+} metal iyonu inhibe etti. *L. plantarum* bakterisinden üretilerek ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan hibrit PL enzim aktivitesi üzerine 1 mM ve 5 mM Hg_2^{2+} hariç Ca^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} metal iyonlarının enzimleri aktive ettiği belirlendi. *A. pallidus* bakterisinden üretilerek ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan serbest PL enzim aktivitesi üzerine 1 mM ve 5 mM Hg_2^{2+} hariç Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} ve Ca^{2+} aktive etti. *A. pallidus* bakterisinden üretilerek ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan hibrit PL enzim aktivitesi üzerine 1 mM Hg_2^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} metal iyonlarının hepsi aktive etti ve 5 mM Hg_2^{2+} ve Cu^{2+} inhibe ederken Ca^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} metal iyonlarının enzimleri aktive ettiği belirlendi. *P. fragi*'den üretilerek ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan serbest PL enzim aktivitesi üzerine 1 mM Cu^{2+} , Hg_2^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} ve Mg^{2+} metal iyonları aktive etti ve 5 mM Hg_2^{2+} ve Mg^{2+} inhibe ederken Ca^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} aktive etti. *P. fragi*'den üretilerek ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan hibrit PL enzim aktivitesi üzerine 1 mM Cu^{2+} , Hg_2^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} ve Mg^{2+} metal iyonları aktive etti ve 5 mM Hg_2^{2+} inhibe ederken Ca^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} metal iyonlarının enzimleri aktive ettiği belirlendi.

Nadaroğlu *et al.*, 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada çeşitli metal iyonlarının pektin liyaz aktivitesi üzerindeki etkisi 10 mM'de test etmişlerdir. Saflaştırılmış pektin liyaz, 10 mM Hg_2^{2+} , Mn^{2+} , EDTA, β -merkaptotanol ve SDS tarafından tamamen inhibe edilmiş ve Ca^{2+} , Mg^{2+} , L-Sistein, Askorbik asit (10 mM) varlığında hafif bir aktivasyon etkisi gözlemişlerdir. Mg^{2+} (10 mM) uyarılırken PL 10 mM Zn^{2+} , Cu^{2+} ve Fe^{2+} aktivitesi inhibe etmiştir.

PL enzimi üzerine Ag^+ , Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Hg_2^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ , Mn^{2+} metal iyonlarının ve EDTA, sodyum arsenat, sodyum azid, potasyum permanganat ve potasyum ferrosiyanür gibi protein inhibitörlerinin etkileri 1.0 mM konsantrasyonlarında çalışmışlardır. Ag^+ , Cu^{2+} , Hg_2^{2+} , potasyum ferrosiyanür ve potasyum permanganatın saflaştırılmış pektin liyaz aktivitesini tamamen inhibe ederken Co^{2+} 'nın PNL aktivitesini hafifçe arttırdığını gözlemlenmiştir (Yadav *et al.* 2008).

L. plantarum bakterisinden üretilerek ÜFA metodu ile saflaştırılan hibrit PL enzimi pektin, locust bean gum ve kitin substratlarına karşı serbest PL enzime kıyasla daha yüksek aktivite gösterdiği belirlendi. Serbest PL enziminin pektin, locust bean gum ve kitin substratı için V_{max} değerleri sırasıyla 153,85 $\mu\text{mol/Ldk}$, 5,62 $\mu\text{mol/Ldk}$, 66,67 $\mu\text{mol/Ldk}$ olarak

hesaplandı. Hibrit PL enziminin ise pektin, locust beam gum ve kitin substratlarına karşı V_{max} değerleri sırasıyla 169,5 $\mu\text{mol/Ldk}$, 13,37 $\mu\text{mol/Ldk}$ ve 192,31 $\mu\text{mol/Ldk}$ olarak hesaplandı. Serbest PL enziminin pektin, locust bean gum ve kitin substratı ile K_m değerleri sırasıyla 0,77 mg/mL, 0,58 mg/mL, 0,19 mg/mL olarak hesaplandı. Hibrit PL enziminin ise pektin, locust beam gum ve kitin substratlarına karşı K_m değerleri ise sırasıyla 0,39 mg/mL, 0,36 mg/mL ve 0,17 mg/mL olarak hesaplandı. *Aeribacillus pallidus* bakterisinden üretilerek ÜFA metodu ile saflaştırılan hibrit PL enzimi pektin, locust beam gum ve kitin substratlarına karşı serbest PL enzimine kıyasla daha yüksek aktivite gösterdiği belirlendi. Serbest PL enziminin pektin, locust bean gum ve kitin substratı ile V_{max} değerleri sırasıyla 55,87 $\mu\text{mol/Ldk}$, 18,55 $\mu\text{mol/Ldk}$, 47,17 $\mu\text{mol/Ldk}$ olarak hesaplandı. Hibrit PL enziminin ise pektin, locust beam gum ve kitin substratlarına karşı V_{max} değerleri sırasıyla 107,53 $\mu\text{mol/Ldk}$, 16,47 $\mu\text{mol/Ldk}$ ve 56,18 $\mu\text{mol/Ldk}$ olarak hesaplandı. Serbest PL enziminin pektin, locust bean gum ve kitin substratı ile K_m değerleri sırasıyla 0,52 mg/mL, 0,76 mg/mL, 0,45 mg/mL olarak hesaplandı. Hibrit PL enziminin ise pektin, locust beam gum ve kitin substratlarına karşı K_m değerleri sırasıyla 0,5 mg/mL, 0,3 mg/mL ve 0,32 mg/mL olarak hesaplandı. *P. fragi* bakterisinden üretilerek ÜFA metodu ile saflaştırılan hibrit PL enzimi pektin, locust beam gum ve kitin substratlarına karşı serbest PL enzimine kıyasla daha yüksek aktivite gösterdiği belirlendi. Serbest PL enziminin pektin, locust bean gum ve kitin substratı ile V_{max} değerleri sırasıyla 70,42 $\mu\text{mol/Ldk}$, 5,29 $\mu\text{mol/Ldk}$, 37,03 $\mu\text{mol/Ldk}$ olarak hesaplandı. Hibrit PL enziminin ise pektin, locust beam gum ve kitin substratlarına karşı V_{max} değerleri sırasıyla 81,97 $\mu\text{mol/Ldk}$, 8,06 $\mu\text{mol/Ldk}$ ve 75,19 $\mu\text{mol/Ldk}$ olarak hesaplandı. Serbest PL enziminin pektin, locust bean gum ve kitin substratı ile K_m değerleri ise sırasıyla 0,63 mg/mL, 0,56 mg/mL, 0,41 mg/mL olarak hesaplandı. Hibrit PL enziminin ise pektin, locust beam gum ve kitin substratlarına karşı K_m değerleri sırasıyla 0,49 mg/mL, 0,5 mg/mL ve 0,33 mg/mL olarak hesaplandı.

A. flavus'tan pektin liyaz için belirlenen K_m ve k_{cat} değerleri, 37°C'de substrat olarak narenciye pektini kullanılarak, pektinin inhibe edici konsantrasyonu göz ardı edilerek sırasıyla 0,59 mg/ml ve 52.2 s^{-1} olarak hesaplamışlardır. Lineweaver Burk dönüşümü kullanılarak verilerin doğrusallaştırılmasıyla hesaplanan K_m ve k_{cat} değerleri yalnızca yaklaşık olarak ele alınabilir. Bu değerlerin literatür değerleri ile karşılaştırılması yapılabilir. Diğerleri, *Penicillium oxalicum*, izolat F-7, *Rizopus oryzae* için sırasıyla 1,1, 4,6 ve 3,87 mg/mL K_m değerleri ve *Penicillium canescens*'in pektin liyazı için 25-133 s^{-1} aralığında k_{cat} değerleri bildirmişlerdir (Yadav *et al.* 2008).

Lu *et al.*, 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada *Zygoascus hellenicus* V25'den ekzopoligalakturonaz enzimini saflaştırarak poligalakturonazın K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 5.44 mg/mL ve 61.73 $\mu\text{mol}/(\text{dk}\cdot\text{mg})$ belirlemişlerdir.

Nadaroğlu *et al.*, 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada *Bacillus pumilus* (P9) bakterisinden saflaştırdıkları PL enziminin K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 0,298 mg/mL ve 132,6 $\mu\text{mol}/\text{Ldak}$ olarak belirlemişlerdir.

Demir *et al.*, 2011 yılında yaptıkları bir çalışmada *Geobacillus stearothermophilus* Ah22'den üreterek saflaştırdıkları pektin liyaz enziminin K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 0,47 mg/mL ve 355,3 $\mu\text{mol}/\text{Ldak}$ olarak belirlemişlerdir.

L. pantarum'dan üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan serbest ve hibrit nanoçiçek pektin liyaz enzimi ile muamele edilen çilek, dağ çileği, siyah üzüm, nar, portakal, elma ve vişne pürelerinden meyve suyu üretim prosesinde parçalanma oranı, verimi ve meyve suyu berraklığı saf su kullanılan kontrol grubuna göre parçalanma oranı en fazla serbest ve hibrit PL ile muamele edilen elma suyunda %23 ve %31,03 olarak hesaplandı. %verim ise en fazla nar meyvesinde serbest ve hibrit PL enzimi kullanılan meyve pürelerinde sırasıyla %45,45 ve %81,81 olarak hesaplandı. 660 nm'de optik dansisite ölçümünde serbest ve hibrit PL ile muamele edilen portakal meyvesinde sırası ile %27,6 ve %80,78 ve elma meyvesinde sırası ile %9,01 ve %91,34 azalma tespit edildi.

A. pallidus'dan üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan serbest ve hibrit nanoçiçek pektin liyaz enzimi ile muamele edilen çilek, dağ çileği, siyah üzüm, nar, portakal, elma ve vişne pürelerinden meyve suyu üretim prosesinde parçalanma oranı, verimi ve meyve suyu berraklığı saf su kullanılan kontrol grubuna göre parçalanma oranı en fazla serbest ve hibrit PL ile muamele edilen vişne suyunda %16,04 ve %76,38 olarak hesaplandı. Verim ise en fazla portakal meyvesinde serbest ve hibrit PL enzimi kullanılan meyve pürelerinde sırasıyla %15,38 ve %23,08 olarak hesaplandı. 660 nm'de optik dansisite ölçümünde serbest ve hibrit PL ile muamele edilen elma meyvesinde sırası ile %62,04 ve %86,21 azalma tespit edildi.

P. fragi'den üretilen ve üçlü faz ayırma metoduna göre saflaştırılan serbest ve hibrit nanoçiçek pektin liyaz enzimi ile muamele edilen çilek, dağ çileği, siyah üzüm, nar, portakal, elma ve vişne pürelerinden meyve suyu üretim prosesinde parçalanma oranı, verimi ve meyve suyu berraklığı saf su kullanılan kontrol grubuna göre parçalanma oranı en fazla serbest ve hibrit PL ile muamele edilen dağ çileği meyve suyunda %43,4 ve %48,67 olarak hesaplandı. Verim ise en fazla çilek meyvesinde serbest ve hibrit PL enzimi kullanılan meyve pürelerinde

sırasıyla %23,07 ve %38,46 olarak hesaplandı. 660 nm’de optik dansisite ölçümünde serbest ve hibrit PL ile muamele edilen elma meyvesinde sırası ile %4,46 ve %94,23 azalma tespit edildi.

EPG4 (endo-poligalakturonaz), papaya suyunun ekstraksiyonu üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. 3.6 U/ml EPG4 ile muameleden sonra, papaya suyunun verimi %24,4 arttığını, içsel viskozite %42,4 azaldığını ve ışık geçirgenliği %29,5 arttığını hesaplamışlardır. Ticari bileşik pektinaz (3,6 U/ml) verimi %25,6 arttırdığını, intrinsik viskoziteyi %42,9 azalttığını ve geçirgenliği %29,9'dan fazla arttırdığını hesaplamışlardır. Pektine ek olarak, bitki dokusu ayrıca selüloz, hemiselüloz ve nişasta içerir, bu nedenle EPG4, selülaz ve ksilanaz içeren ticari pektinazdan biraz daha az etkili olduğunu ifade etmişlerdir (Cheng *et al.*, 2016).

α -amilaz, pektinaz ve selülaz enzimleri üçü birlikte, meyve suyu berraklaştırması için bir tri-enzim manyetik nanobiyokatalizör elde etmek için amino işlevselleştirilmiş manyetik nanoparçacık üzerine aynı anda birlikte immobilize edildi. Üç enzimli manyetik nanobiyokatalizör, serbest enzimlerle karşılaştırıldığında $t_{1/2}$ ortalama 2,4 kat arttığı için üstün termal stabilite (50-70 °C) sergilediğini göstermişlerdir. Immobilize enzim ayrıca daha düşük pH’da (3-6) bile yüksek stabilite sergilemiştir. Immobilize formda α -amilaz, pektinaz ve selülaz için K_m değerleri daha yüksek, V_{max} değerleri ise azalmış olarak hesaplamışlardır. Dikkat çekici bir şekilde, tri-enzim manyetik nanobiyokatalizör, yüksek stabilitesini vurgulayan 8 kez tekrar kullanımdan sonra bile ilk aktivitesinin %77'sini koruduğunu deneysel çalışmaları ile göstermişlerdir. Ayrıca, elma, ananas ve üzüm sularının berraklaştırılması için kullanılan immobilize manyetik biyokatalizör, ayrı ayrı immobilize formun karışımından daha iyi olan 150 dakikalık işleme kadar sırasıyla %41, 53 ve 46'ya varan bulanıklıkta hızlı azalma göstermişlerdir (Cheng *et al.*, 2016).

Sonuç

Sağlıklı beslenme ve kaliteli yaşam bilincine sahip tüketicilerden sağlıklı gıda ürünlerine olan talep, küresel meyve suyu pazarının önde gelen güçlerinden biridir. Bu nedenle, küresel meyve suyu pazarının önümüzdeki yıllarda güçlü bir büyümeye tanık olması muhtemeldir. Bu pazarın sürekli genişlemesi, meyve suyu işleme endüstrileri ve gıda bilimcilerin, taze meyvenin orijinalliğini, rengini, aromasını, besin değerini ve yapısal özelliklerini mümkün olduğunca korumak için yenilikçi yöntemler geliştirmesi için artan fırsatlarla ilişkilidir. Daha fazla gelişmeye hala ihtiyaç duyulmasına rağmen, bu sonuçlar, hibrit nanoçiçek yapılarının endüstrilerde geleneksel meyve suyu işleme için potansiyel bir alternatif olabileceğini öne sürmüştür. Farklı zararsız

mikroorganizmalardan elde ettiğimiz hem serbest hemde Hibrit nanoçiçek PL enzim yapılarının meyve suyu berraklaştırma endüstrisinde etkili bir şekilde kullanılabileceği anlaşılmıştır.



KAYNAKLAR

- Abdel-Naby, M., Hashem, A.M., Esawy, M.A., Abdel-Fattah, A.F., 1998. Immobilization of *Bacillus subtilis* α -amylase and characterization of its enzymatic properties. *MicrobioL Res.*, 153, 1-000.
- Adejuwon, A.O., Olutiola, P.O., 2007. Pectin lyase activity in culture medium of *Lasiodiplodia theobromae*. *J Plant Sci.* 2:334–40.
- Ahmad, R., Sardar, M., 2015. Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix. *Biochem Anal Biochem.* 4:2.
- Aksoy, M., 2010. Termofilik *Brevibacillus brevis* bakterisinden pektin liyaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve bitkisel yağ eldesinde kullanılabilirliğinin incelenmesi. Y.Lisans Tezi.
- Alana, A., Alkorta, I., Dominguez, J.B., Liama, M.J., Serra, J.L., 1990. Pectin lyase activity in a *Penicillium italicum* strain. *Appl Environ Microbiol.* 56:3755–9.
- Alana, A., Gabilondo, A., Hernando, F., Moragues, M.D., Dominguez, J.B., Liama, M.J., *et al.*, 1989. Pectin lyase production by a *Penicillium italicum* strain. *Appl Environ Microbiol.* 55:1612–6.
- Albersheim, P., 1966. Pectin lyase from fungi. *Methods Enzymol.* 8:628–31.
- Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M.J. and Serra J.L., 1996. Immobilization of pectin lyase from *Penicillium italicum* by covalent binding to nylon. *Enzyme and Microbial Technology* 18:141-146.
- Altinkaynak, C., Tavlasoglu, S., Özdemir, N., Ocsoy, I., 2016. A new generation approach in enzyme immobilization: Organic-inorganic hybrid nanoflowers with enhanced catalytic activity and stability. *Enzyme and Microbial Technology.* 93–94: 105–112.
- Altinkaynak, C., Yılmaz, I., Köksal, Z., Özdemir, H., Ocsoy, I., Özdemir, N., 2016. Preparation of lactoperoxidase incorporated hybrid nanoflower and its excellent activity and stability. *International Journal of Biological Macromolecules* 84 (2016) 402–409.
- Ansari, S.A., Husain, Q., 2012. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnology Advances* 30: 512–523.
- Atav, R., Yurdakul, A., Arabacı, A., 2009. Tekstil boyacılığında kullanılan tuzların özellikleri ve kullanım amaçları, *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3, 71-80.
- Aydar, S., 2012. Tiyofen Ve 3,4- Etilendioksitiyofen Donör Gruplarının Benzotiyadiazol Akseptör Grubuyla Yaptığı Dad Tipi İletken Polimerlerde Enzim İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi.
- Babagil, A., 2018. Pektin Liyaz Enziminin Mikroorganizmalardan Saflaştırılması ve Karakterize Edilmesi, Enzimin Ca^{2+} -Hibrit Nanoçiçek Yapısının Hazırlanması Ve Meyve Suyu Durultmasında Kullanımının Araştırılması. Doktora Tezi.
- Baldemir, A., Kose, N.B., Ildız, N., Ilgun, S., Yusufbeyoğlu, S., Yılmaz, V., Ocsoy, I., 2017. Synthesis and characterization of green tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) extract and its major components-based nanoflowers: a new strategy to enhance antimicrobial activity. *RSC Adv.* 7: 44303–44308.

- Baracat, P.M.C., Minussi, R.C., Coelho, J.L.C., Silva, D.O., 1997. Tea extract as an inexpensive inducer of pectin lyase in *Penicillium grieseororesum* cultured on sucrose. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 18:308–11.
- Barredo, J.L., 2005. *Methods in Biotechnology*TM 17: Microbial enzymes and biotransformations. 1-27. Human Press, Totowa, New Jersey.
- Benen, J., Parenicova, L., Kusters-van Someren, M., Kester, H., Visser, J., 1996. Molecular genetic and biochemical aspects of pectin degradation in *Aspergillus*. In: Visser J, Voragen AGJ, editors. *Pectins and pectinases*, vol. 14. Amsterdam: Elsevier Science. 331–46.
- Bibi, F., Irshad, M., Anwar, Z., Bhatti, K.H., Raza, A., 2017. Improved catalytic functionalities of purified pristine and chitosan-immobilized polygalacturonase, and pectin lyase. *Chemical Engineering Research and Design.* 128:146-154.
- Blanca, J, Munoz, P., Morgado, M., Mendez, N., Aranda, A., Reuvers, T., *et al.*, 2005. Determination of clenbuterol, ractopamine and zilpaterol in liver and urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta.*529(1-2):199–205.
- Bowron, D. T., Finney, J. L., 2003. Structure of a salt - amphiphile - water solution and the mechanism of salting out, *J. Chem. Phys.*, 118, 8357-8372.
- Boyer, C., Bulmus, V., Liu, J., Davis, TP., Stenzel,MH., Barner-Kowollik, C., 2007. Welldefined protein–polymer conjugates via in situ RAFT polymerization. *J Am Chem Soc.*129(22):7145–54
- Brien, P.A.O., Zamani, M., 2003. Production of pectic enzymes by bare patch isolates of *Rhizoctonia solani* AG 8. *Austral Plant Pathol.*, 32:65–72.
- Brodelius, P. and Mosbach, K., 1987. Immobilization Techniques for Cells/Organelles. In: *Methods in Enzymology*, volume 135, (Mosbach, K., ed.), Academic Press, London, pp. 173–454.
- Bruhlmann, F., Leupin, M., Erismann, K.H., 2000. Fiechter A. Enzymatic degumming of ramie bast fibers. *J Biotechnol.* 76:43–50.
- Buchholz, K., and Klein, J., 1987. Characterization of Immobilized Biocatalysts. In: *Methods in Enzymology* volume 135, (Mosbach, K., ed.), Academic Press, London, pp. 3–30.
- Bullock, C., 1995. Immobilised enzymes. *Sci Progress.* 78:119–34.
- Cao, J., Zheng, L., Chen, S., 1992. Screening of pectinase producer from alkalophilic bacteria and study on its potential application in degumming of ramie. *Enzyme Microb Technol.* 14:1013–6.
- Carpita, N.C., Gibeaut, D.M., 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3:1–30.
- Chaplin, M.F., Bucke, C., 1990. *Enzyme technology*. Cambridge University Press.
- Chatterjee, A., McEvoy, J.L., Chambost, J.P., Blasco, F., Chatterjee, A.K., 1991. Nucleotide sequence and molecular characterization of *pnlA*, the structural gene for damage inducible pectin lyase of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*71. *J Bacteriol.* 173:1765–9.
- Cheng, Z., Chen, D., Lu, B., Wei, Y., Xian, L., Li, Y., Luo, Z., Huang, R., 2016. A Novel Acid-Stable Endo-Polygalacturonase from *Penicillium oxalicum* CZ1028: Purification, Characterization, and Application in the Beverage Industry. *J. Microbiol. Biotechnol.* (2016), 26(6), 989–998.

- Collins, J.K., Thornton, G., Sullivan, G.O., 1998. Selection of probiotic strains for human applications, *Int. Dairy J.* 8 (5) 487–490.
- Cooper, R.M., 1984. Infection, damage and loss. In: Woods RKS, Jellis GJ, editors. *Plant diseases*. Oxford: Blackwell Scientific Publications. p. 13–27.
- Crabb, W.D., Mitchinson, C., 1997. Enzymes involved in the processing of starch to sugars. *Trends Biotechnol* 15:349.
- Croisier, F., Jerome, C., 2013. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *Eur. Polym. J.*, 49 pp. 780-792.
- Cui, J., Jia, S., 2017. Organic–inorganic hybrid nanoflowers: A novel host platform for immobilizing biomolecules. *Coordination Chemistry Reviews* 352 (2017) 249–263.
- Cui, J., Zhao, Y., Liu, R., Zhong, C., Jia, S., 2016. Surfactant-activated lipase hybrid nanoflowers with enhanced enzymatic performance. *Scientific Reports*. | 6:27928.
- Çakmak, T., 2016. Bakır/Gümüş/Çinko Oksit (CuAg/Zn) Partiküllerinin Ultrasonik Sprey Piroliz Yöntemiyle Üretimi. İTÜ. Yüksek lisans tezi.
- Çalcı, E., Demir, T., Çelem, E.B. ve Önal, S., 2010. Purification of tomato (*Lycopersicon esculentum*) α -galactosidase by three phase partitioning and its characterization, *Separation and Purification Technology*, 70, 123-127.
- Çelik, S.Y., Demir, Y., Demir, N., Güllüce, M., Barış, Ö., 2015. Agrobacterium radiobacter'den Pektin Liyaz Enziminin Üretilmesi, Saflaştırılması, Karakterize Edilip Meyve Suyu Üretiminde Kullanılması. *Akademik Gıda* 13(3) 216-222.
- Darvil, A.G., McNeil, M., Albersheim, P., 1978. Structure of plant cell walls VIII. A new pectic polysaccharide. *Plant Physiol.* 62:418–22.
- Datta, S., Christena, L.R., Rani, Y., Rajaram, S., 2013. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Biotech* 3:1–9.
- de Vries, R., 1999. Accessory enzymes from *Aspergillus* involved in xylan and pectin degradation. PhD thesis. Netherlands: The Wageningen Agricultural University.
- Delaittre, G., Reynhout, I.C., Cornelissen, J.J., Nolte, R.J., 2009. Cascade reactions in an all-enzyme nanoreactor. *Chem Eur J.* 15(46):12600–3.
- Demir, N., Nadaroglu, H., Demir, Y., Işık, C., Taşkın, E., Adigüzel, A., Güllüce, M., 2014. Purification and characterization of an alkaline pectin lyase produced by a newly isolated *Brevibacillus borstelensis* (P35) and its applications in fruit juice and oil extraction. *Eur Food Res Technol.* 239:127–135.
- Demir, N., Nadaroglu, H., Taşkın, E., Adigüzel, A. and Güllüce, M., 2011. Purification and characterization of a pectin lyase produced by *Geobacillus stearothermophilus* Ah22 and its application in fruit juice production. *Ann Microbiol.* 61:939–946.
- Dennison, C., Lovrien, R., 1997. Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. *Protein Expr Purif* 11: 149-161.
- Dhananjay, S.K., Mulimani, V.H., 2008. Purification of α - galactosidase and invertase by three-phase partitioning from crude extract of *Aspergillus oryzae*, *Biotechnol. Lett.*, 30, 1565-1569.
- Diano, N., Grimaldi, T., Bianco, M., Rossi, S., Gabrovská, K., Yordanova, G., Godjevargova, T., Grano, V., Nicolucci, C., Mita, L., Bencivenga, U., Canciglia, P. and Mita, D., 2008. Apple Juice Clarification by Immobilized Pectolytic Enzymes in Packed or Fluidized Bed Reactors. *J. Agric. Food Chem.* 56, 11471–11477.

- Doğan, G., 2008. Yeni Nesil Polimerik Nanoyapıların Hazırlanması Ve Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılması
- Duan, J.H., He, D.W., Wang, W.S., Liu, Y.C., Wu, H.P., Wang, Y.S., *et al.*, 2013. Glassy carbon electrode modified with gold nanoparticles for ractopamine and metaproterenol sensing. *Chem Phys Lett.* 574:83–8.
- Dutta, P.K., Ravikumar, M.N.V., Duttai J., 2002. Chitin and chitosan for versatile applications. *J Macromol Sci.*, C42:307–54
- Ercolini, D., Casaburi, A., Nasi, A., *et al.* 2010. Different molecular types of *Pseudomonas fragi* have the same overall behaviour as meat spoilers. *Int J Food Microbiol*;142:120–31.
- Gagaoua, M. and Hafid, K., 2016. Three phase partitioning system, an emerging non chromatographic tool for proteolytic enzymes recovery and purification. *Biosensors Journal*, 5:1
- Gagaoua, M., 2014. Three-phase partitioning as an efficient method for the purification and recovery of fcin from Mediterranean fg (*Ficus carica* L.) latex. *Separation and Purification Technology* 132: 461-467.
- Gagaoua, M., Hoggas, N., Hafid, K., 2015. Three phase partitioning of zingibain, a milk-clotting enzyme from *Zingiber officinale* Roscoe rhizomes. *Int J Biol Macromol* 73: 245-252.
- Ge, J., Lei, J., Zare, RN., 2012. Protein–inorganic hybrid nanoflowers. *Nat Nanotechnol.* 7(7):428–32
- Gemeiner, P., 1992. Materials for enzyme engineering. In: *Enzyme Engineering* (Gemeiner, P., ed.), Ellis Horwood, New York, NY, pp. 13–119.
- Gerhartz, W., 1990. *Enzymes in industry: production and applications*. VCH, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 321 pp.
- Gibriel, A.Y., Amin, A.A., Nessrien Yassien, N. M., El Banna, H.A., Khaled, F.M., 2014. Immobilization techniques for *P. aculeatum* dextranase. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 3(9) 1114-1134.
- Godfrey, T. and West, S., 1996. *Introduction to Industrial Enzymology*. (T.Godfrey and S. West editör) Industrial Enzymology, 2nd Edition, Stockton Pres, New York.
- Goodsell, D.S., 2004. The Quest For Nanotechnology. *Bionanotechnology lessons from nature*. 1-8.
- Govardhan, C.P., 1999. Crosslinking of Enzymes for Improved Stability and Performance. *Current Opinion in Biotechnology*, 10:331-335
- Gummadi, S.N., Kumar, D.S., 2006. Optimization of chemical and physical parameters affecting the activity of pectin lyase and pectate lyase from *Debaryomyces nepalensis*: A statistical approach. *Biochemical Engineering Journal* 30:130–137.
- Gupta, M., and Mattiasson, B., 1992. Unique applications of immobilized proteins in bioanalytical systems. In: *Methods of Biochemical Analysis*, volume 36, (Suelter, C.H., ed.), Wiley, New York, NY, pp. 1–34.
- Hartmeier, W., 1988. *Immobilized Biocatalysts*, Springer-Verlag, Berlin.
- He, L., Su, Y., Zeng, Z., Liu, Y., Huang, X., 2007. Determination of ractopamine and clenbuterol in feeds by gas chromatography–mass spectrometry. *Anim Feed Sci Technol.* 132(3–4):316–23.

- Hirakawa, H., Kamiya, N., Tanaka, T., Nagamune, T., 2007. Intramolecular electron transfer in a cytochrome P450cam system with a site-specific branched structure. *Protein Eng Des Sel.* 20(9):453–9.
- Hoondal, G.S., Tewari, R.P., Tewari, R., Dahiya, N., Beg, Q.K., 2002. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol.* 59:409–18.
- Hosokawa, M., Nogi, K., Naito, M., & Yokoyama, T. (2012). *Nanoparticle Technology Handbook*, Oxford: Elsevier.
- Hu, R., Zhang, X., Zhao, Z., Zhu, G., Chen, T., Fu, T., *et al.*, 2014. DNA nanoflowers for multiplexed cellular imaging and traceable targeted drug delivery. *Angew Chem Int Ed.* 53(23):5821–6.
- Hua, X., Xing, Y., Zhang, X., 2016. Enhanced Promiscuity of Lipase-Inorganic Nanocrystal Composites in the Epoxidation of Fatty Acids in Organic Media. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 8, 16257-16261.
- Ibrahim, D., Weloosamy, H., Sheh-Hong, L., 2014. Potential use of nylon scouring pad cubes attachment method for pectinase production by *Aspergillus niger* HFD5A-1. *Process Biochemistry* 49:660–667.
- Irshad, M., Murtza, A., Zafar, M., Bhatti, K. H., Rehman, A., Anwar, Z., 2017. Chitosan-immobilized pectinolytics with novel catalytic features and fruit juice clarification potentialities. *International Journal of Biological Macromolecules.* 242-250.
- Jain, K.K., 2008. *The Handbook of Nanomedicine*. Humana Press. 1-5, Switzerland.
- Jain, S., Singh, R. and Gupta, M.N., 2004. Purification of recombinant green fluorescent protein by three – phase partitioning, *Journal of Chromatography A.*, 1035: 83-86.
- Jayani, R.S., Saxena, S., Gupta, R., 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry* 40:2931–2944.
- Jesionowski, T., Zdzarta, J., Krajewska, B., 2014. Enzyme immobilization by adsorption: A review. *Adsorption* 20:801–821.
- Jiao, Y., Chen, F., Zhao, B., Yang, H., Zhang, J., 2012. Anatase grain loaded brookite nanoflower hybrid with superior photocatalytic activity for organic degradation. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 402: 66–71.
- Jin, W., Yang, G., Shao, H., Qin, A., 2014. A label-free impedimetric immunosensor for detection of 1-aminohydantoin residue in food samples based on sol–gel embedding antibody. *Food Control.* 39:185–91.
- Jong-Chon, K., Kim, H.Y., Choi, Y.J., 1998. Production and characterization of acidstable pectin lyase from *Bacillus* sp. PN33. *J Microbiol Biotechnol* 1998;8: 353–60.
- Kamimiya, S., Izaki, K., Takahashi, H., 1972. A new pectolytic enzyme in *Erwinia aroideae* formed in the presence of nalidixic acid. *Agric Biol Chem.* 36:2367–72.
- Kapoor, M., Beg, Q.K., Bhushan, B., Singh, K., Dadhich, K.S., Hoondal, G.S., 2001. Application of alkaline thermostable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-ep-2 in degumming of ramie (*Boehmeria nivea*) and sunn hemp (*Crotalaria juncea*) bast fibers. *Process Biochem* 2001;6:803–7.
- Kennedy, J.F., Cabral, J.M.S., 1983. Immobilized enzymes. In: Scouten WH, editor. *Solid phase biochemistry. Analytical and synthetic aspects*. New York: John Wiley & Sons. p. 253–391

- Kharisov, I.B., 2008. A review for synthesis of nanoflowers. *Recent Pat Nanotechnol.* 2:190–200
- Kim, J., Grate, J.W., 2003. Single-enzyme nanoparticles armored by a nanometerscale organic/inorganic network. *Nano Lett.* 3(9):1219–22
- Kim, J., Grate, J.W., Wang, P., 2008. Nanobiocatalysis and its potential applications. *Trend Biotechnol.* 26(11):639–46.
- Kim, K.H., Jeong, J.M., Lee, S.J., Choi, B.G., Lee, K.G., 2016. Protein-directed assembly of cobalt phosphate hybrid nanoflowers. *Journal of Colloid and Interface Science* 484 : 44–50.
- Koser, S., Anwar, Z., Iqbal, Z., Anjum, A., Aqil, T., Mehmood, S., Irshad, M., 2014. Utilization of *Aspergillus oryzae* to produce pectin lyase from various agro-industrial residues. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, (7), 327-332.
- Kotwal, S.M, Shankar, V., 2009. “Immobilized invertase”, *Biotechnology Advances*, 27: 311-322.
- Krajewska, B., 1991. Chitin and its derivatives as supports for immobilization of enzymes. *Acta Biotechnol*, 11:269–77.
- Krajewska, B., 2003. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme and Microbial Technology.* 126–139.
- Kumar, V., Debtanu, B., Suvra, R., Sagar, C.M., 2011. Clinical Enzymes and Their Application. *Nz Aquaculture.* pp 12-13.
- Lahiani, H.T., Gargouri, A., 2007. Cloning, genomic organisation and mRNA expression of a pectin lyase gene from a mutant strain of *Penicillium occitanis*. *Gene.* 388:54–60.
- Lara-Márquez, A., Oyama, K., Zavala-Páramo, M.G., Villa-Rivera, M.G., Conejo-Saucedo, U., Cano-Camacho, H., 2017. Evolutionary Analysis of Pectin Lyases of the Genus *Colletotrichum*. *J Mol Evol.* 85:120–136.
- Lattuada, M. and Hatton, T.A., 2011. Synthesis, properties and applications of Janus nanoparticles. *Nano Today.*6(3):286–308.
- Lee, E., Jung, S.R., Lee, S.Y., Lee, N.K., Paik, H.D., Lim, S.I., 2018. *Lactobacillus plantarum* strain Ln4 attenuates diet-induced obesity, insulin resistance, and changes in hepatic mRNA levels associated with glucose and lipid metabolism, *Nutrients* 10 (5) 643.
- Lee, H.R., Chung, M., Kim, M., Ha, S.H., 2017. Preparation of glutaraldehyde-treated lipase inorganic hybrid nanoflowers and their catalytic performance as immobilized enzymes. *Enzyme and Microbial Technology* 105:24–29.
- Lee, S.W., Cheon, S. A., Kim, M.I., and Park, T.J., 2015. Organic–inorganic hybrid nanoflowers: types, characteristics, and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, 13:54.
- Lei, C., Shin, Y., Liu, J., Ackerman, E.J., 2002. Entrapping enzyme in a function nanoporous support. *J Am Chem Soc.* 124(38):11242–3.
- Li, J., Jiang, Z.Y., Wu, H., Zhang, L., Long, L.H., Jiang, Y.J., 2010. Constructing inorganic shell onto LBL microcapsule through biomimetic mineralization: a novel and facile method for fabrication of microbioreactors. *Soft Matter.* 6(3):542–50
- Li, M., Luo, M., Li, F., Wang, W., Liu, K., Liu, Q., Wang, Y., Lu, Z., Wang, D., 2016. Biomimetic Copper-Based Inorganic-Protein Nanoflower Assembly Constructed on the Nanoscale Fibrous Membrane with Enhanced Stability and Durability. *J. Phys. Chem. C.* 120, 17348-17356.

- Li, Y., Fei, X., Liang, L., Tian, J., Xu, L., Wang, X., Wang, Y., 2016. The influence of synthesis conditions on enzymatic activity of enzyme-inorganic hybrid nanoflowers. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 133:92–97.
- Li, Z., 2013. Simultaneously concentrating and pretreating of microalgae *Chlorella* spp. by three-phase partitioning. *Bioresour Technol* 149: 286–291.
- Lima, J.O., Pereira, J.F., Araújo, E.F., Queiroz, M.V., 2017. Pectin lyase overproduction by *Penicillium griseoroseum* mutants resistant to catabolite repression. *Brazilian Journal of Microbiology*. 48:602–606.
- Lin, Z., Xiao, Y., Wang, L., Yin, Y., Zheng, J., Yang, H., *et al.*, 2014. Facile synthesis of enzyme-inorganic hybrid nanoflowers and their application as an immobilized trypsin reactor for highly efficient protein digestion. *RSC Adv.* 4(27):13888–91.
- Lin, Z., Xiao, Y., Yin, Y., Hu, W., Liu, W., Yang, H., 2014. Facile synthesis of enzyme–inorganic hybrid nanoflowers and its application as a colorimetric platform for visual detection of hydrogen peroxide and phenol. *ACS Appl Mater Interf.* 6(13):10775–82
- Liu, M., Ning, B.A., Qu, L.J., Peng, Y., Dong, J.W., Gao, N., *et al.*, 2012. Development of indirect competitive immunoassay for highly sensitive determination of ractopamine in pork liver samples based on surface plasmon resonance sensor. *Sens Actuat B Chem.* 161(1):124–30.
- Liu, Y., Cui, Y., Mukherjee, A., Chatterjee, A.K., 1997. Activation of the *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* pectin lyase structural gene *pnlA*: a role for RdgB. *Microbiology* 143:705–12.
- Liu, Y., Shao, X., Kong, D., Li, G., Li, Q., 2021. Immobilization of thermophilic lipase in inorganic hybrid nanoflower through biomimetic mineralization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 197: 111450
- Lovrien, R., Dennison, C., 1997. Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. *Protein Expr Purif* 11: 149–161
- Luther, W. (2008). *Application of Nanotechnologies in the Energy Sector*, Düsseldorf: HA Hessen.
- Magro, L.D., Kornecki, J.F., Klein, M.P., Rodrigues, R.C., Fernandez-Lafuente, R., 2020. Pectin lyase immobilization using the glutaraldehyde chemistry increases the enzyme operation range. *Enzyme and Microbial Technology* 132: 109397.
- Manesh, K.M., Santhosh, P., Uthayakumar, S., Gopalan, A.I., Lee, K.P., 2010. One-pot construction of mediatorless bi-enzymatic glucose biosensor based on organic–inorganic hybrid. *Biosens Bioelectron.* 25(7):1579–86.
- Marco, M.L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C.J., Cotter, P.D., Foligné, B., Gänzle, M., Kort, R., Pasin, G., Pihlanto, A., Smid, E.J., and Hutkins, R., 2017. Health benefits of fermented foods: Microbiota and beyond. *Curr. Opin. Biotechnol.* 44:94–102. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.010>.
- Martins, E.S., Silva, D., Da Silva, R., Gomes, E., 2002. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochem.* 37:949–54.
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R., 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology* 40:1451–1463.
- Mayans, O., Scott, M., Connerton, I., Gravesen, T., Benen, J., Visser, J., *et al.*, 1997. Two crystal structures of pectin lyase A from *Aspergillus* reveal a pH driven

- conformational change and striking divergence in the substrate-binding clefts of pectin and pectate lyases. *Structure*. 5:677–89.
- McEvoy, J.L., Murata, H., Chatterjee, A.K., 1990. Molecular cloning and characterization of an *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* pectin lyase gene that responds to DNA-damaging agents. *J Bacteriol*. 172:3284–9.
- Minana-Galbis, D., Pinzón, DL, Lorén, JG, Manresa, A, Oliart-Ros, RM., 2010. Reclassification of *Geobacillus pallidus* (Scholz *et al.* 1988) Banat *et al.* 2004 as *Aeribacillus pallidus* gen nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 60, pp. 1600-1604.
- Minussi, R.C., Baracat-Pereira, M.C., Coelho, J.L.C., Silva, D.O., 1997. Methylxanthines as inducers of pectin lyase in *Penicillium griseoroseum* cultured on sucrose. *Lett Appl Microbiol*;24:369–72.
- Minussi, R.C., Coelho, J.L.C., Baracat, P.M.C., Silva, D.O., 1996. Pectin lyase production by *Penicillium griseoroseum*: effect of tea extract, caffeine, yeast extract and pectin. *Biotechnol Lett*;18:1283–6.
- Minussi, R.C., Soarse-ramos, J.R.L., Coelho, J.L.C., 1998. Sugar-cane juice induces pectin lyase and polygalacturonase in *Penicillium griseoroseum*. *Rev Microbiol*;29:246–50.
- Mohnen, D., 1999. Biosynthesis of pectins and galactomannans. In: Barton D, Nakanishi K, Meth-Cohn O, editors. *Comprehensive natural products chemistry*, vol. 3. Amsterdam: Elsevier Science. 497–527.
- Mourya, V.K., Inamdar, N.N., 2008. Chitosan-modifications and applications: opportunities galore. *React. Funct. Polym.*, 68, pp. 1013-1051.
- Mutenda, K.E., Korner, R., Christensen, T.M.I.E., Mikkelsen, J., Roepstorff, P., 2002. Application of mass spectrometry to determine the activity and specificity of pectin lyase A. *Carbohydr Res*. 337:1217–27.
- Nadar, S.S., Gawas, S.D., Rathod, V.K., 2016. Self-assembled organic–inorganic hybrid glucoamylase nanoflowers with enhanced activity and stability. *International Journal of Biological Macromolecules* 92:660–669.
- Nadaroglu, H., Taskin, E., Adiguzel, A., Gulluce. and M., Demir, N., 2010. Production of a novel pectin lyase from *Bacillus pumilus* (P9), purification and characterisation and fruit juice application. *Romanian Biotechnol Lett.*, 15 (2): 5167-5176.
- Nakagawa, T., Nagaoka, T., Miyaji, T., Tomizuka, N., 2005. A cold active pectin lyase from psychrophilic and basidiomycetous yeast *Cystofilobasidium capitatum* strain PPY-1. *Biotechnol Appl Biochem*. 42:193–6.
- Nakagawa, T., Yamada, K., Miyaji, T., Tomizuka, N., 2002. Cold-active pectinolytic Activity of psychrophilic basidiomycetous yeast *Cystofilobasidium capitatum* strain PPY-1. *J Biosci Bioeng*. 94:175–7.
- Nedjma, M., Hoffmann, N. and Belarbi, A., 2001. Selective and sensitive detection of pectin lyase activity using a colorimetric test: application to the screening of microorganisms possessing pectin lyase activity. *Analytical, Biochemistry*. 291 (2): 290-296
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2008 *Lehninger Principles of Biochemistry*, W.H Freeman, Fifth Edition.
- Nguyen, H.A., Kaneko, J, Kamio, Y. 2002. Temperature-dependent production of carotovoricin Er and pectin lyase in phytopathogenic *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* Er. *Biosci Biotechnol Biochem*. 66:444–7.

- Nostro, P., Lo., Ninham B.W., 2012. Hofmeister phenomena: an update on ion specificity in biology, *Chem. Rev*, 112, 2286-2322
- O'Neill, M.A., Albersheim, P., Dravill, A.G., 1990. The pectic polysaccharides of primary cell walls. In: Dey PM, editor. *Methods in plant biochemistry*, vol. 2. London: Academic Press. p. 415-41.
- Ocsoy, I., Dogru, E., Usta, S., 2015. A new generation of flowerlike horseradish peroxidases as a nanobiocatalyst for superior enzymatic activity. *Enzyme and Microbial Technology* 75-76: 25-29.
- Palmer, T., 2001. *Enzymes: Biochemistry, Biotechnology and Chemical Chemistry*. Horwood Publication, Chichester, UK, pp.191-222.
- Palmer, T., 2007. "Enzymes", Horwood Publishing, England, 361-370
- Palombo, F., Paolantoni, M., Sassi, P., Morresi, A., Cataliotti, R. S., 2006. Spectroscopic studies of the "free" OH stretching bands in liquid alcohols, *J. Mol. Liq.*, 125, 139-146.
- Paul, W., Sharma, C.P., 2000. Chitosan, a drug carrier for the 21st century: a review. *STP Pharmaceut Sci.*, 10:5-22.
- Peng, C.C., Zhang, B., and Wang, W., 2019. Genome sequence of *Aeribacillus pallidus* W-12, a thermophilic bacterium containing possible biodesulfurization and bionitrification pathways. *Microbiol Resour Ann.*, 8, p. 2.
- Perez-Fuentes, C., Ravanal, M.C., Eyzaguirre, J., 2014. Heterologous expression of a *Penicillium purpurogenum* pectin lyase in *Pichia pastoris* and its characterization. *Fungal Biology* 118: 507-515.
- Peter, M., 1995. Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. *J Macromol Sci Pure Appl Chem*, A32:629-40.
- Phadtare, S., Vinod, V.P., Wadgaonkar, P.P., Rao, M., Sastry, M., 2004. Free-Standing Nanogold Membranes as Scaffolds for Enzyme Immobilization. *Langmuir*, 20, 3717-3723.
- Piccoli-Valle, R.H., Brandi, I.V., Silva, D.O., Passos, F.J.V., 2001. Pectin lyase production by *Penicillium griseoroseum* grown in sugar cane juice in repeated batch cultures. *World J Microbiol Biotechnol*;17:433-7.
- Picraux, S.T., 2018. Nanotechnology. *Encyclopaedia Britannica*. <https://www.britannica.com/technology/nanotechnology>. 1-21.
- Pirhonen, M., Saarilahti, H., Karlsson, M.B., Palva, E.T., 1991. Identification of pathogenicity determinates of *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* by transposon mutagenesis. *Mol Plant-Microbe Interact*. 4:276-83.
- Poturcu, K., 2012. Termofilik *Aspergillus niger*'den pektin liyaz enziminin saflastırılması ve karakterizasyonu. *Y.Lisans Tezi*.
- Rajdeo, K., Harini, T., Lavanya, K., Fadnavis, N.W., 2016. Immobilization of pectinase on reusable polymer support for clarification of apple juice. *Food and Bioproducts Processing* 99:12-19.
- Ralet, M.C., Dronnet, V., Buchholt, H.C., Thibault, J.F., 2001. Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: characterisation, polyelectrolyte behavior and calcium binding properties. *Carbohydr Res*. 336:117-25.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M. Gathe, M.S., Deshpande, W., 1998. Molecular and Biotechnological aspect of Microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3):597-635.

- Rawdkuen, S., Chaiwut, P., Pintathang, P. ve Benjakul, S., 2010. Three-phase partitioning of protease from *Calotropis procera* latex, *Biochem. Eng. J.*, 50: 145-149
- Rawdkuen, S., Vanabun, A., Benjakul, S., 2012. Recovery of proteases from the viscera of farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*) by three-phase partitioning. *Process Biochemistry* 47: 2566-2569.
- Roboz, E., Barratt, R.W., Tatum, E.L., 1952. Breakdown of pectic substances by a new enzyme from *Neurospora*. *J Biol Chem.* 195:459–71.
- Rouanet, C., Nomura, K., Tsuyumu, S., Nasser, W., 1999. Regulation of *pelD* and *pelE*, encoding major alkaline pectate lyases in *Erwinia chrysanthemi*: involvement of the main transcriptional factors. *J Bacteriol.* 184:5948–57.
- Sakiyama, C.C.H., Paula, E.M., Pereira, P.C., Borges, A.C., Silva, D.O., 2001. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. *Lett Appl Microbiol.* 33:117–21.
- Sassi, A.H., Trigui-Lahiani, H., Abdeljalil, S., Gargouri, A., 2017. Enhancement of solubility, purification and inclusion-bodies-refolding of an active pectin lyase from *Penicillium occitanis* expressed in *Escherichia coli*. *International Journal of Biological Macromolecules* 95: 256–262.
- Sathyanarayana, N.G., Kumar, D.S., 2006. Optimization of chemical and physical parameters affecting the activity of pectin lyase and pectate lyase from *Debaryomyces nepalensis*: a statistical approach. *Bioresource Technol* 30:130–7.
- Sathyanarayana, N.G., Kumar, D.S., 2008. Batch and fed batch production of pectin lyase and pectate lyase by novel strain *Debaryomyces nepalensis* in bioreactor. *Bioresource Technol* 99:874–81.
- Saxena, L., Iyer, B.K., Ananthanarayan, L., 2007. Three phase partitioning as a novel method for purification of ragi (*Eleusine coracana*) bifunctional amylase/ protease inhibitor. *Process Biochemistry* 42: 491-495.
- Schärftl, W., 2000. Crosslinked spherical nanoparticles with core-shell topology. *Adv Mater.* 12(24):1899–908.
- Schlemmer, A.F., Ware, C.F., Keen, N.T., 1987. Purification and characterization of a pectin lyase produced by *Pseudomonas fluorescens* W51. *J Bacteriol* 169:4493–8.
- Schoffers, E., Golebiowski, A., Johnson, C.R., 1996. Enantioselective synthesis through enzymatic asymmetrization. *Tetrahedron* 52:3769.
- Schols, H.A., Geraeds, C.C.J.M., Searle-van Leeuwen, M.F., Kormelink, F.J.M., Voragen, A.G.J., 1990. Rhamnogalacturonase: a novel enzyme that degrades the hairy regions of pectins. *Carbohydr Res.* 206:106–15.
- Scouten, W.H., Luong, J.H.T., Brown, R.S., 1995. Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design. *TIBTECH.* 13:178–85.
- Sharma, A. and Gupta, M.N., 2001. Purification of pectinases by three – phase partitioning, *Biotechnology Letters*, 23:1625- 1627.
- Shen, L., Bao, N., Prevelige, P.E., Gupta, A., 2010. Fabrication of ordered nanostructures of sulfide nanocrystal assemblies over self-assembled genetically engineered P22 coat protein. *J Am Chem Soc.*132(49):17354–7
- Shi, J.F., Zhang, S.H., Wang, X.L., Yang, C., Jiang, Z.Y., 2014. Preparation and enzymatic application of flower-like hybrid microcapsules through a biomimetic mineralization approach. *J Mater Chem B.* 2(27):4289–96.

- Shimizu, S., Ogawa, J., Kataoka, M., Kobayashi, M., 1997. Screening of novel microbial enzymes for the production of biologically and chemically useful compounds. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 58, 45-87.
- Shishani, E., Chai, S.C., Jamokha, S., Aznar, G., Hoffman, M.K., 2003. Determination of ractopamine in animal tissues by liquid chromatography-fluorescence and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 483(1–2):137–45.
- Singh, M., Manikandan, S., and Kumaraguru, A. K., 2011. Nanoparticles: a new technology with wide applications. *Research Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 1, no. 1, pp. 1–11.
- Soares, M.M.C.N., Silva, R., and Gomes, E., 1999. Screening of Bacterial Strains for Pectinolytic Activity: Characterization of the Polygalacturonase Produced by *Bacillus* sp. *Revista de Microbiologia*, 30:299-303.
- Sojitra, U.V., Nadar, S.S., Rathod, V.K., 2017. Immobilization of pectinase onto chitosan magnetic nanoparticles by macromolecular cross-linker. *Carbohydrate Polymers*. 157: 677-685.
- Somturk, B., Hancer, M., Ocsoy, I., Özdemir, N., 2015. Synthesis of copper ion incorporated horseradish peroxidase-based hybrid nanoflowers for enhanced catalytic activity and stability. *Dalton Trans.*, 44, 13845–13852.
- Somturk, B., Yılmaz, I., Altınkaynak, C., Karatepe, A., Özdemir, N., Ocsoy, I., 2016. Synthesis of urease hybrid nanoflowers and their enhanced catalytic properties. *Enzyme and Microbial Technology* 86: 134–142.
- Sun, J., Ge, J., Liu, W., Lan, M., Zhang, H., Wang, P., *et al.*, 2014. Multi-enzyme coembedded organic–inorganic hybrid nanoflowers: synthesis and application as a colorimetric sensor. *Nanoscale*. 6(1):255–62.
- Suykerbuyk, M.E.G., Schaap, P.J., Musters, W., Visser, J., 1995. Cloning, sequence and expression of the gene for rhamnogalacturonan hydrolase of *Aspergillus aculeatus*; a novel pectinolytic enzyme. *Appl Microbiol Biotechnol*. 43:861–70.
- Tang, W., Xing, Z., Li, C., Wang, J., Wang, Y., 2017. Molecular mechanisms and in vitro antioxidant effects of *Lactobacillus plantarum* MA2, *Food Chem*. 221 1642–1649.
- Taragano, V.M.T., Pilosof, A.M.R., 1999. Application of Doehlert designs for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 25:411-419.
- Thakur, B.R., Singh, R.K., Handa, A.K., 1997. Chemistry and uses of pectin – a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 37:47–73.
- Tischer, W., Wedekind, F., 1999. Immobilized enzymes: methods and applications. *Top Curr Chem*. 200:95–126.
- Tosa, T., Mori, T. Fuse, N., and Chibata, I. (1966) Studies on continuous enzyme reactions. I. Screening of carriers for preparation of water-insoluble aminoacylase. *Enzymologia*. 31, 214–224.
- Tran, D.N., Balkus, K.J., 2011. Perspective of Recent Progress in Immobilization of Enzymes. *ACS Catal*. 956-968
- Trevan, M. (1980) Effect of Immobilization on Enzyme Activity. In: *Immobilized Enzymes. An Introduction and Applications in Biotechnology* (Trevan, M. ed.), Wiley, Chichester-New York, pp. 11-56.

- Trevañ, M. (1980) Techniques of Immobilization. In: Immobilized Enzymes. An Introduction and Applications in Biotechnology (Trevañ, M., ed.), Wiley, Chichester-New York, pp. 1–9.
- Tsuyumu, S., Funakubo, T., Chatterjee, A.K., 1985. Purification and partial characterization of a mitomycin C-induced pectin lyase of *Erwinia chrysanthemi* strain EC183. *Physiol Plant Pathol.* 27:119–30.
- Turner, M.K., 1995. Biocatalysis in organic chemistry, Part 1, Past and present (1800-1995). *Trends Biotechnol* 13, 173-177.
- van Alebeek, G.J.W.M., Christensen, T.M.I.E., Schols, H.A., Mikkelsen, J.D., Voragen, A.G.J., 2002. Mode of action of pectin lyase A of *Aspergillus niger* on differently C6-substituted oligogalacturonides. *J Biol Chem.* 277:25929–36.
- Visser, J., Bussink, H.J., Witteveen, C., 2004. Gene expression in filamentous fungi. In: Smith A, editor. Gene expression in recombinant microorganisms. New York: Marcel Dekker Inc. p. 241–308.
- Vitali, J., Schick, B., Kester, H.C.M., Visser, J., Jurnak, F., 1998. The three-dimensional structure of *Aspergillus niger* pectin lyase B at 1.7-Å Resolution. *Plant Physiol.* 116:69–80.
- Voragen, A.G.J., 1972. Characterization of pectin lyases on pectins and methyl oligogalacturonates. PhD thesis. Netherland: Wageningen University.
- Wang, G.Y., Wang, H.H., Han, Y.W., *et al.* 2017. Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from chilled chicken in vitro and in situ. *Food Microbiol.* 63:139–46.
- Wang, J., Zeng, Y., Wang, S., Liu, H., Zhang, D., Zhang, W., Wang, Y., Ji, H., 2018. Swine-derived probiotic *Lactobacillus plantarum* inhibits growth and adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* and mediates host defense, *Front. Microbiol.* 9 1364.
- Wang, L.B., Wang, Y.C., He, R., Zhuang, A., Wang, X., Zeng, J., *et al.* 2013. A new nanobiocatalytic system based on allosteric effect with dramatically enhanced enzymatic performance. *J Am Chem Soc.* 135(4):1272–5.
- Wang, X., Chen, Q., Lü, X., 2014. Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water. *Food Hydrocoll.* 38, 129–137.
- Wang, X., Shi, J., Li, Z., Zhang, S., Wu, H., Jiang, Z., Yang, C., Tian, C., 2014. Facile One-Pot Preparation of Chitosan/Calcium Pyrophosphate Hybrid Microflowers. *American Chemical Society.* 6(16):14522–32.
- Whitaker, J.R., 2015. Analytical Applications of Enzymes. ACS Publications. Chapter 2. pp 31-78.
- Whitaker, J.R., 1990. Microbial pectolytic enzymes. In: Fogarty WM, Kelly CT, editors. Microbial enzymes and biotechnology. 2nd ed., New York: Elsevier Applied Science; p. 133–76.
- Wijesundera, R.L.C., Bailey, J.A., Byrde, R.J.W., 1984. Production of pectin lyase by *Colletotrichum lindemuthionum* in culture and in infected bean (*Phaseolus vulgaris*) tissue. *J Gen Microbiol* ;130:285–90.
- Woodley, J.M., 1992. Immobilized biocatalysts. *Solid Supports Catal Org Synth* 254–271.
- Wu, C., Sun, D., Li, Q., Wu, K.B., 2012. Electrochemical sensor for toxic ractopamine and clenbuterol based on the enhancement effect of graphene oxide. *Sens Actuat B Chem.* 168:178–84

- Yadav, S., Yadav, P.K., Yadav, D., Yadav, K.D.S., 2008. Purification and characterization of an alkaline pectin lyase from *Aspergillus flavus*. *Process Biochemistry*, (43) 547–552.
- Yadav, S., Yadav, P.K., Yadav, D., Yadav, K.D.S., 2009. Pectin lyase: A review. *Process Biochemistry* 44:1–10
- Yan, M., Ge, J., Liu, Z., Ouyang, P., 2006. Encapsulation of single enzyme in nanogel with enhanced biocatalytic activity and stability. *J Am Chem Soc.* 128(34):11008–9.
- Yan, M., Liu, Z., Lu, D., Liu, Z., 2007. Fabrication of single carbonic anhydrase nanogel against denaturation and aggregation at high temperature. *Biomacromolecules.* 8(2):560–5.
- Yasawong, M., Areekit, S., Pakpitchareon, A., Santiwatanakul, S., Chansiri, K., 2011. Characterization of thermophilic halotolerant *Aeribacillus pallidus* TD1 from Tao dam hot spring. Thailand. *Int J Mol Sci.*, 12, pp. 5294–5303.
- Yin, Y., Xiao, Y., Lin, G., Xiao, Q., Lin, Z., Caib, Z., 2015. An enzyme–inorganic hybrid nanoflower based immobilized enzyme reactor with enhanced enzymatic activity. *J. Mater. Chem. B.* 3: 2295.
- Yu, Y., Fei, X., Tian, J., Xu, L., Wang, X., Wang, Y., 2015. Self-assembled enzyme–inorganic hybrid nanoflowers and their application to enzyme purification. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 130 299–304.
- Zaborsky, O.R., 1973. *Immobilized enzymes* (CRC Press)
- Zhang, G., Deng, C., Shi, H., *et al.*, 2016. ZnO/Ag composite nanoflowers as substrates for surface-enhanced Raman scattering. *Appl Opt.* 55:9105–9112.
- Zhang, J., 2006. Biochemical study and technical applications of fungal pectinase. *Acta Universitatis Upsaliensis. Digital comprehensive summaries of Uppsala Dissertations From Faculty of Science and Technology.* p. 14.
- Zhang, Y., Wang, R., Ge, J., Liu, Z., Zare, R.N., 2013. Rapid detection of phenol using a membrane containing laccase nanoflowers. *Chem Asian J.*;8(10):2358–60.
- Zhang, Z., Zhang, Y., Song, R., Wang, M., Yan, F., He, L., *et al.*, 2015. Manganese(II) phosphate nanoflowers as electrochemical biosensors for the high-sensitivity detection of ractopamine. *Sens Actuat B Chem.* 211:310–7.
- Zhang, Y., Ge, J., Liu, Z., 2015. Enhanced Activity of Immobilized or Chemically Modified Enzymes. *Acs Catal.* 5, 4503–4513.
- Zhao, F., Wang, Q., Dong, J., Xian, M., Yu, J., Yin, H., Chang, Z., Mu, X., Hou, T., Wang, J., 2017. Enzyme-inorganic nanoflowers/alginate microbeads: An enzyme immobilization system and its potential application. *Process Biochemistry* 57 (2017) 87–94.
- Zheng, C., *et al.*, 2012. Characterization and emulsifying property of a novel bioemulsifier by *Aeribacillus pallidus* YM-1. *J. Appl. Microbiol.* 113, 44–51.
- Zhou, J.F., Gao, P.K., Dai, X.H., Cui, X.Y., Tian, H.M., Xie, J.J., Li, G.Q., Ma, T., 2018. Heavy hydrocarbon degradation of crude oil by a novel thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain A-2. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 126, pp. 224–230.
- Zhu, X., Huang, J., Liu, J., Zhang, H., Jiang, J. and Yu, R., 2017. A dual enzyme–inorganic hybrid nanoflower incorporated microfluidic paper-based analytic device (μ PAD) biosensor for sensitive visualized detection of glucose. *The Royal Society of Chemistry Nanoscale.* 9:5658–5663.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Hicran ÖNEM
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Sıdika Rodop Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi
Lisans:	Atatürk Üniversitesi Kimya Öğretmenliği
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi Nanobiyoteknoloji
Doktora:	Atatürk Üniversitesi Nanobiyoteknoloji
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İYİ
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
Tezden Üretilmiş Yayınlar	